Aenderungen der intra- und extrazellulären Konzentrationen von zyklischem AMP, zyklischem GMP, sowie von Calcium während der Bildung von Aggregationssignalen bei Dictyostelium discoideum

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Wick
aus Westerland/Sylt

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548922_0012

Aenderungen der intra- und extrazellulären Konzentrationen von zyklischem AMP, zyklischem GMP, sowie von Calcium während der Bildung von Aggregationssignalen bei Dictyostelium discoideum

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Wick
aus Westerland/Sylt

1979

Für die Ueberlassung des interessanten Themas und die Betreuung während der Promotionszeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Gerisch bedanken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe in Tübingen und in Basel, besonders Herrn Dr. D. Malchow, danke ich herzlichst für wertvolle Diskussionen und zahlreiche Ratschläge.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	15. Februar 1979
Dekan:	Prof. Dr. F. Oberwinkler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gerisch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Seyffert

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methoden	11
2.1.	Kulturmethoden	11
2.2.	Aufarbeitung der Zellsuspension zur optischen Messung	11
2.3.	Messung von Lichtstreuungsänderungen	12
2.4.	Präparation der "dichten geschüttelten Zellsuspension" zur cAMP-Bestimmung	12
2.4.1.	"Schnelle Membranfiltrations-Silikonzentrifugationstechnik"	12
2.4.2.	Aufarbeitung der "intra- und extrazellulären Proben" zur cAMP-Bestimmung	15
2.5.	Bestimmung des cAMP nach dem Gilmantest	15
2.5.1.	Testansatz- und bedingungen	16
2.5.1.1.	Testansatz	16
2.5.1.2.	Lösungen des Testansatzes	16
2.5.1.3.	Testdurchführung	18
2.5.1.4.	Testbedingungen	19
2.5.2.	Kontrollversuche zur "Störeichkurve"	20
2.5.2.1.	"Recovery-Kontrolle" an nichtzellulären Proben	20
2.5.2.2.	"Recovery-Kontrolle" an zellulären Proben	21
2.5.2.3.	Nachbestimmung von zellulären Proben	22
2.5.2.4.	Phosphodiesterase-Kontrolle	22
2.6.	cAMP- und cGMP-Bestimmung nach einem Radioimmunoassay	23
2.6.1.	Testansatz- und durchführung für cAMP	23
2.6.1.1.	Testansatz	
2.6.1.2.	Herstellung der "unbekannten cAMP-Proben"	25
2.6.1.3.	Herstellung der "intra- und extrazellulären Störproben"	25
2.6.1.4.	Testdurchführung	26
2.6.2.	cGMP-Bestimmung nach einem Radioimmunoassay	27
2.7.	Ermittlung der cAMP-Ausschüttungsrate- und Pulsgrösse durch Phosphodiesterasemessungen	27
2.7.1.	Testansatz- und durchführung	28

		Seite
2.7.2.	Chromatographie der PDE-Proben	28
2.7.3.	Berechnung der Hydrolyserate	28
2.8.	^{45}Ca-Vormarkierung von Zellsuspensionen für ^{45}Ca-Release-Messungen	29
2.9.	^{45}Ca-Influx-Messungen nach cAMP- und 5'AMP-Pulsen an nicht vormarkierten Zellen bei $22\pm1^{o}C$ und $13\pm1^{o}C$	30
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Verlauf des cAMP-Spiegels bei spontanen Oscillationen	32
3.1.1.	Intra- und extrazelluläre cAMP-Oscillationen bei spontanen Spike-artigen Lichtstreuungsänderungen	32
3.1.2.	Fehlende Signalkopplung bei Sinusschwingungen	36
3.2.	Verlauf des cAMP-Spiegels bei induzierten Lichtstreuungsänderungen	37
3.2.1.	Fehlende cAMP-Antworten bei vegetativen Zellen	37
3.2.2.	cAMP- und cGMP-Verlauf bei präaggregationsreifen Zellen nach einem cAMP-Puls	38
3.2.3.	Verschiedene Muster im cAMP-Verlauf nach Stimulierung durch cAMP bei aggregationsreifen Zellen	42
3.3.	Refraktärität der Zellen in bezug auf induzierte Signale während spontaner Oscillationen	46
3.3.1.	Refraktärität der Zellen bei Mehrfachstimulierung durch cAMP	50
3.4.	Niedrige Temperaturen und ihre Auswirkungen auf die Signalform bei induzierten Antworten	50
3.4.1.	cAMP-Verlauf nach cAMP-Pulsen bei $13^{o}C$	50
3.4.2.	cAMP-Verlauf nach cAMP-Pulsen bei $3^{o}C$	53
3.5.	Beziehung zwischen der zellulären cAMP-Konzentration und der Ausschüttungsrate	55
3.6.	EGTA- und Ca^{++}-Gaben: ihre Wirkung auf spontane Oscillationen	58
3.7.	Verlauf des cAMP- und cGMP-Spiegels bei spontan oscillierenden Zellen vor und nach EGTA-$CaCl_2$-Gaben	59

Seite

3.8. Spontaner ^{45}Ca-Release bei EDTA-behandelten und unbehandelten Zellen 63

3.9. Aenderungen der ^{45}Ca-Abgabe nach cAMP-Pulsen an ^{45}Ca-markierten Zellen 66

3.10. ^{45}Ca-Aufnahme nach cAMP-Pulsen an nicht vormarkierten Zellen bei 22° C und bei 13°C 68

4. Diskussion

4.1. Aenderungen im intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel bei spontanen optischen Oscillationen 71

4.2. Die Wirkung von cAMP-Pulsen auf den internen und externen cAMP-Spiegel während verschiedener Entwicklungsstadien 75

4.3. Refraktärität der Zellen gegenüber externen cAMP-Stimuli 80

4.4. cGMP-Spiegel bei spontanen optischen Oscillationen und nach cAMP-Pulsen 81

4.5. Der Einfluss von Ca^{++} auf das Signalsystem 82

4.6. cAMP-stimulierter Ca^{++}-Einstrom 83

5. Zusammenfassung 86

6. Literaturverzeichnis 89

1. Einleitung

Der Aufbau eines komplexen biologischen Organismus ist gekennzeichnet durch bestimmte räumliche Anordnung und Differenzierung seiner einzelnen Zellen. Dieser Prozess beinhaltet zeitliche und räumliche Organisation, Informationsverarbeitung, Steuerung und Kommunikation. Eine Voraussetzung dazu ist die Zellerkennung, die zwischen Nachbarzellen mittels spezifischer an der Zelloberfläche gelegener Kontaktstrukturen erfolgt, während sie über grössere Distanzen durch freigesetzte lösliche Faktoren vermittelt wird. Die Untersuchung der damit verbundenen Fragestellungen an Geweben ist sehr schwierig, da durch künstliche Dissoziation die Strukturen in den neben- und übereinandergelagerten Zellen zerstört wird.

Als attraktives Modell hierfür bietet sich der Mikroorganismus Dictyostelium discoideum an, ein zellulärer Schleimpilz, während dessen Lebenszyklus sich ein Uebergang vom Einzeller zum Vielzeller vollzieht. Solange Nahrung vorhanden ist, bleiben die Zellen einzeln, amöboid beweglich und teilen sich. Diese Wachstumsphase geht mit dem Nahrungsverbrauch zu Ende und ein neues Stadium, die Aggregationsphase, beginnt. Während dieser bewegen sich die Zellen gerichtet auf spontan entstehende Zellansammlungen, die Aggregationszentren, zu. Aus diesen Aggregaten entsteht schliesslich ein vielzelliger Fruchtkörper, der zwei Zelltypen, Stiel- und Sporenzellen, enthält (1,2).

Die Aggregation ist ein durch Chemotaxis gesteuerter Vorgang, wobei sich die Zellen von der Peripherie zu einem signalisierenden Zentrum hinbewegen. Ins Medium ausgeschüttete, diffundierende Substanzen sind bei diesem Signalsystem als Transmitter beteiligt. Konijn et al. (3) und Bonner et al. (4) haben gezeigt, dass cAMP als chemotaktisches Agens wirkt. cAMP scheint auch der Träger des Erregungssignals zu sein, denn, in Pulsen appliziert, kann es Wellenausbreitung im Medium hervorrufen (5). Der einfachste Mechanismus für die zentripetale Bewegung der Amöben ist der Aufbau

eines kontinuierlichen chemischen Gradienten, wobei die Konzentration des chemotaktisch wirksamen Faktors im Aggregationszentrum am höchsten ist. Die Amöben sind zwar in der Lage, auf kontinuierliche Gradienten zu reagieren, doch haben Beobachtungen der Zellen im Aggregationsfeld gezeigt, dass sie eher auf diskontinuierliche vom Zentrum gesendete Signale antworten (6,7,8,2). Ein Aggregationszentrum gibt alle 2-10 min einen "Puls" chemotaktischer Substanz ab; jede dieses Signal empfangende Zelle sendet selbst wiederum mit einer Verzögerung von ca. 15 sec ein Signal (2,9).

Die sich ausbreitenden Pulse erscheinen im Aggregationsfeld - in einem "dichten Zellausstrich" - als Erregungswellen, die sich in konzentrischen oder spiraligen Mustern vom Zentrum zur Peripherie fortpflanzen (2,10). Bei Dunkelfeldoptik werden die Wellen als hellere und dunklere Banden sichtbar, entsprechend länglicher sich bewegender und abgerundeter ruhender Zellen (11). Die konstante Ausbreitungsgeschwindigkeit (ca. 40-500µm/min) ist abhängig von der Zelldichte (2,11). Die Wellen entstehen durch gleichzeitige pulsartige Bewegung der Amöben, als Antwort auf das vom Zentrum gesendete Signal, wie es Zeitrafferfilme zeigen (11).

Der unmittelbare chemotaktische Einfluss eines Zentrums erfasst nur ein kleines Areal, da cAMP schnell durch hydrolysierende Enzyme abgebaut wird (11). Die Organisation eines ausgedehnten Aggregationsfeldes erfordert einen Relaymechanismus, bei dem jede stimulierte Zelle die nächste wiederum zur Aussendung eines Signals anregt (12). Versuche, bei denen ein cAMP-Stimulus die Zellen zur cAMP-Ausschüttung anregt, weisen auf solch ein Relaysystem hin (13, 14,15). Durch eine Refraktärphase, in der die Zellen nicht durch cAMP erregt werden können, wird eine unidirektionale Signalausbreitung gewährleistet (9,16,17).

Das Signalsystem von Dictyostelium unterliegt einer entwicklungsabhängigen Regulation. Während der Präaggregationsphase steigt die Sensitivität der chemotaktischen Reaktion auf Pulse des Aggregationszentrums an; gleichzeitig

nimmt die Sensitivität der Amöben für cAMP zu (4). Die Fähigkeit zur Wellenausbreitung im "dichten Zellausstrich" entwickelt sich (5).

Als ideale Methode zur Untersuchung biochemischer Fragestellungen am Signalsystem hat sich die Verwendung von dichten, ständig geschüttelten Zellsuspensionen erwiesen. Während bei Amöbenkulturen auf festem Substrat die Konzentration chemischer Substanzen durch inhomogene Verteilung nicht konstant ist, treten bei Zellsuspensionen keine Konzentrationsgradienten auf. Gerisch und Hess (18) haben an Zellsuspensionen hoher Zelldichte in einer mit Sauerstoff versorgten Küvette photometrische Messungen bei 405 nm durchgeführt. Die beobachteten Aenderungen der Lichtstreuung - hier als "optische Antwort" bezeichnet - können durch verschiedene Veränderungen der Zellen wie: unterschiedliche Zellstreckung, Filopodienausbildung verursacht werden.

Zwischen den im "dichten Zellausstrich" beobachteten Wellenmustern und den "light-scattering Antworten", die als vorübergehende Reduktion der Lichtstreuung messbar sind, besteht in verschiedener Hinsicht eine Korrelation. Wie die Fähigkeit zur Wellenausbreitung tritt die Ausbildung spontaner Oscillationen der optischen Dichte in Zellsuspensionen erst während der Präaggregationsphase auf. Vegetative Zellen zeigen keine spontanen optischen Aktivitäten. Zwischen t_3 - t_6 jedoch beginnen die Zellen, spontan Spike-förmige Signale zu produzieren, mit einer Periodenlänge von ca. 7 min und einer Amplitude von ca. 2% (18). Diese Spikes gehen nach einer gewissen Zeit in sinusförmige Oscillationen über, die mehrere Stunden anhalten können. Durch cAMP-Pulse können die Spikeoscillationen beeinflusst werden. Je nach dem Zeitpunkt der cAMP-Zugabe kommt es zum verfrühten oder verzögerten Einsetzen der optischen Spikes oder zur Phasenverschiebung; durch hohe cAMP-Zugabe können die Oscillationen ausgelöscht werden (18).

Die durch cAMP-Pulse hervorgerufenen optischen Antworten zeigen während der Differenzierungsstadien typische Muster, d.h. sie unterliegen einer entwicklungsabhängigen

Kontrolle. Während vegetative Zellen nach einem künstlich applizierten cAMP-Puls nur ein einziges optisches Signal - die sog. "schnelle Antwort" - ausprägen, erscheint bei aggregationsreifen Zellen ein Doppelpeak, zusammengesetzt aus der "schnellen" und "langsamen" Antwort (18). Die induzierte optische Antwort ist spezifisch für cAMP, denn andere zyklische Nukleotide wie cGMP oder cJMP müssen in 1000fach höherer Dosis injiziert werden, um ein äquivalentes optisches Signal hervorzurufen (18).

In der "geschüttelten Suspension" messen die Zellen nicht absolute Konzentrationen, sondern Konzentrationsänderungen in der Zeit (dc/dt), denn z.B. kontinuierlich zugegebenes cAMP ruft keine optische Reaktion hervor (18). Gleichzeitig jedoch sind die Zellen in der Lage, sich in einem stationären Konzentrationsgradienten zu orientieren, d.h. Konzentrationsänderungen im Raum (dc/ds) zu messen (10). Nach einem Modell von Gerisch (19,20) besitzen die Zellen Sensoren, die zwar nur zeitliche Konzentrationsänderungen messen, wobei es jedoch durch die gerichtete Bewegung dieser Sensoren zur Uebersetzung eines vorhandenen räumlichen Gradienten kommt. Ein Vergleich zwischen cAMP- mit cGMP-induzierten optischen Antworten zeigt, dass die Zellen Konzentrationsänderungen in der Zeit messen. Während der cAMP-Puls innerhalb weniger Sekunden durch die membrangebundene Phosphodiesterase (siehe unten) hydrolysiert ist, die zur Stimulierung notwendige hohe cGMP-Menge jedoch nur ganz langsam im Medium abgebaut wird, fällt bei beiden Stimuli der Verlauf der Reaktion mit der gleichen Zeitkonstante ab (20).

Die Wirkung rhythmischer Signale während der Entwicklung der Zellen ist eine zweifache. Sie kontrollieren die chemotaktische Orientierung während der Aggregation. Ausserdem stimulieren sie die Differenzierung vom vegetativen zum aggregationsreifen Zustand. Bestimmte nichtaggregierende Mutanten, die zur Entwicklung die von aggregierenden Wildtypzellen ausgeschütteten Faktoren als Hilfe benötigen, können durch cAMP-Pulse im 5 min Intervall zur normalen

Differenzierung gebracht werden, während die kontinuierliche cAMP-Zugabe einen deutlich geringeren Effekt hat (21). Wildtypzellen erreichen durch cAMP-Pulse das Aggregationsstadium früher als ungepulste Zellen (21). Bei axenisch wachsenden Zellen der späten stationären Phase ist die Differenzierung zur Aggregationsreife geblockt. Durch cAMP-Pulse mit einer Amplitude von 5nM und in 6-7 min Intervallen appliziert kann dieser Block aufgehoben und der normale Ablauf des Entwicklungsprogrammes induziert werden. Ein kontinuierlich appliziertes cAMP-Signal gleicher Höhe blieb jedoch ohne Wirkung. Da der Eintritt in die Aggregationsphase zeitlich korreliert ist mit der Zunahme des EDTA-stabilen, aggregationsspezifischen Zellkontakts, diente bei diesen Versuchen die Aktivität der dafür verantwortlichen Contact sites A als Indikator des Entwicklungszustandes (22).

Die Aufgabe eines Vermittlers zwischen den im extrazellulären Medium diffundierenden Transmittern und den an diese gekoppelten intrazellulären Antworten übernimmt der auf der Zelloberfläche lokalisierte cAMP-Rezeptor. Die hohe Hydrolyseaktivität der Phosphodiesterasen erschwert den Nachweis solcher cAMP-Bindungsstellen. Durch den Einsatz hoher Konzentrationen von Dithiothreitol kann die Phosphodiesteraseaktivität geblockt und die Bindung von cAMP gemessen werden (23,24). Nach Versuchen von Malchow und Gerisch (25,26) kann die Bindung von ^{3}H-cAMP in Gegenwart hoher cGMP-Konzentrationen (0.5 mM) untersucht werden. Die Affinität zu den Phosphodiesterasen ist für cGMP nur wenig niedriger als für cAMP, jedoch ist die Affinität zum Chemorezeptor für cGMP ungefähr 1000fach geringer. Dadurch eignet sich cGMP als kompetitiver Phosphodiesterasen-Inhibitor, denn er verhindert den Abbau der niedrigen ^{3}H-cAMP-Konzentrationen. Beide Methoden zeigen, dass das Erscheinen der cAMP-Rezeptoren einer entwicklungsabhängigen Kontrolle unterliegt. Während die Anzahl in vegetativen Zellen sehr gering ist, sind im Aggregationsstadium bis

10^5-10^6 Bindungsstellen pro Zelle messbar.

Neben den cAMP-Rezeptoren ist das cAMP-synthetisierende Enzym, die Adenylcyclase, ein weiteres Element im Signalsystem von Dictyostelium discoideum. Nach Rossomando und Sussman ist bei Lyse der Zellen durch Triton X-100 (27) oder bei Beschallung (28) eine Enzymaktivität im 100 000 g Ueberstand nachweisbar, wobei sich nach 50-100facher Anreicherung ein MG von 100 000 ergab. Zwischen vegetativen und aggregationsreifen Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Aktivität, die bei 3 nm/mg Protein X min lag. Zur Enzymaktivierung war 5'AMP notwendig, wobei die Aktivierung streng kooperativen Charakter zeigte. Halbmaximale Aktivierung wurde bei 2 mM 5'AMP erreicht (28). Mit der Adenylcyclase zusammen chromatographierte auf 6% Agarose eine ATP-Pyrophosphohydrolase. Dieses Enzym, das ATP in 5'AMP und Pyrophosphat umwandelt, benötigte wiederum millimolare Konzentrationen an cAMP zur Aktivierung, die ebenfalls streng kooperativen Charakter zeigte (28). Die Ueberkreuzstimulierung dieser beiden Enzyme durch ihre jeweiligen Produkte könnte als Basis der pulsartigen cAMP-Bildung dienen. Erhält z.B. eine Zelle ein exogenes cAMP-Signal, würde die ATP-Pyrophosphohydrolase aktiviert werden und 5'AMP produzieren. Dieses 5'AMP wiederum stimuliert nach Rossomando und Sussman die Cyclase zur Synthese von cAMP, von dem ein Teil ins Medium freigesetzt den Kreislauf aufrechterhalten würde.

Goldbeter (29) hat den theoretischen Aspekt eines solchen Feedbackmechanismus zweier Enzyme untersucht. Nach seinem Modell kann es in einem Enzymsystem mit solchem regulatorischen Verhalten zu Oscillationen der cAMP-Synthese kommen mit einer ähnlichen Pulsfrequenz wie sie in Aggregationszentren gefunden wird. Gegen dieses Modell spricht, dass aussergewöhnlich hohe Konzentrationen - im millimolaren Bereich - von cAMP und 5'AMP zur Enzymaktivierung eingesetzt werden müssen. Dies entspricht nicht den in vivo gefundenen Bedingungen, wo z.B. für extrazelluläres cAMP die Konzentration um 3 Grössenordnungen niedriger liegen (13). Weitere

Versuche von Rossomando und Cutler (30) über die Cyclase führten zu anderen Ergebnissen. Sie präparierten nach schonender Lyse der Zellen mit Amphotericin B Plasmamembranvesikel. Nach dieser Methode war 40% der Adenylcyclaseaktivität membrangebunden. Das Enyzm konnte nicht mehr durch 5'AMP stimuliert werden.

Roos (31) konnte zeigen, dass 5'AMP nicht als kooperativer Aktivator der Cyclase wirkt, denn der Zusatz von 1 mM 5'AMP blieb ohne Einfluss auf die cAMP-Synthese. Klein (32) findet sogar einen inhibierenden Effekt von 5'AMP auf die Cyclaseaktivität. Die von Goldbeter (29) und von Goldbeter und Segel (33) erarbeiteten Modelle über die periodische cAMP-Synthese aufgrund des regulatorischen Verhaltens von Cyclase und ATP-Pyrophosphohydrolase (28) schliessen Oscillationen des intrazellulären ATP-Spiegels ein, die jedoch experimentell nicht bestätigt werden konnten (34). Im Gegensatz zu Rossomando und Sussmann (28) finden Klein (32) und Roos (31) eine entwicklungsabhängige Kontrolle der Adenylcyclaseaktivität. Bis zum Erreichen der Aggregationsreife kommt es zu einer starken Zunahme der basalen Adenylcyclaseaktivität, die von kaum messbaren Werten auf ca. 4-10 pMol/mg Protein X min im Aggregationsstadium ansteigt. Häufig ist ein biphasischer Anstieg zu beobachten. Die Aktivitätszunahme kann durch Cycloheximid reversibel geblockt werden und scheint somit auf Enzymneusynthese zu beruhen (31).

Die an Zellsuspensionen beobachteten Oscillationen der Lichtstreuung sind von periodischen Aktivierungen der Adenylcyclase begleitet. Synchron zum optischen Spike kommt es zur vorübergehenden Stimulierung der Cyclase durchschnittlich um den Faktor 7 bei einer Signalbreite von ca. 2 min (31,34). Während der für die späte Aggregationsphase charakteristischen sinusförmigen Lichtstreuungsantworten, die die optischen Spikeoscillationen ablösen, treten keine Oscillationen der Cyclase mehr auf; die gemessenen Schwankungen verbleiben im Bereich der Messgenauigkeit (35).

Neben dem stimulierenden Einfluss auf den Ablauf der Differenzierung in normalen als auch stationären Zellen durch cAMP-Pulse kommt diesen auch eine regulatorische Funktion auf die Cyclase in stationären Zellen zu. cAMP-Pulse rufen verglichen zu unbehandelten Kontrollzellen eine signifikante Erhöhung der biphasisch ansteigenden basalen Adenylcyclaseaktivität bei stationär gewachsenen Zellen hervor. Eine cAMP-Zugabe in kontinuierlichem Fluss blieb wirkungslos (31). Untersuchungen über die Lokalisolation der Cyclase mit Hilfe von cytochemischen Studien ergab, dass das Enzym an die Innenseite der Plasmamembran gebunden ist (36,37).

Während in der Kontrolle der cAMP-Signale die Adenylcyclase den Aufbau der cAMP-Moleküle vermittelt, sorgen Phosphodiesterase sowohl für den Abbau als auch für die Verschärfung der Signale. Rasche Hydrolyse des cAMP zu 5'AMP beschränkt die Dauer des chemotaktischen Signals. Dictyostelium discoideum besitzt zwei extrazelluläres cAMP hydrolysierende Enzyme, eines im extrazellulären Raum (ePD), das andere an der Zelloberfläche lokalisiert (mPD); beide unterliegen einer entwicklungsabhängigen Kontrolle. Während des vegetativen Stadiums erscheint die extrazelluläre Phosphodiesterase im Medium; sie zeigt eine normale Michaelis-Menten-Kinetik (38,39,40). Am Ende der Wachstumsphase geben die Zellen ein hitzestabiles, trypsinempfindliches Molekül ab, das durch Bildung eines Komplexes mit dem Enzym die ePD inhibiert (39,41). Die hydrolytische Funktion der ePD wird während des Aggregationsstadiums weitgehend von der mPD übernommen (42,43). Die Aktivität der mPD ist gering während der vegetativen Phase und erreicht ihre Maximalwerte, wenn die Zellen aggregieren (44). Biochemische (44) wie auch cytochemische Untersuchungen (45) zeigen, dass das Enzym an die äussere Oberfläche der Plasmamembran gebunden ist. Im Gegensatz zur ePD zeigt die Kinetik der mPD eine nichtlineare Charakteristik, aus der auf ein negativ kooperatives Verhalten geschlossen

wurde. Unter in vivo Bedingungen hemmt der ePD-Inhibitor die mPD nicht (46).

Das System der Amöben im "dichten Zellausstrich" besitzt formale Aehnlichkeit mit dem Modell eines "Erregbaren Mediums". Qualitativ sind anregbare Medien solche, die sich in einem stabilen stationären Zustand befinden und die Fähigkeit besitzen, eine überkritische Störung an einem Punkt vorübergehend zu verstärken. Diese verstärkte Störung verursacht, bedingt durch räumliche Kopplung, kleine aber überkritische Störungen in gewissen Nachbarregionen, die wiederum dort verstärkt werden. Das Charakteristikum anregbarer Medien ist also die Fähigkeit, überkritische Störungen in Form eines verstärkten Impulses wellenartig weiterzuleiten (47). Der stationäre Zustand bedeutet nicht absoluter Ruhezustand des Systems. Es können wohl kleine Aenderungen auftreten - bis zur kritischen Störung -, die aber vom System ausgeglichen werden, d.h. reversibel sind, in bezug auf das gerade beobachtete Phänomen. Erst überkritische Störungen heben das System aus dem Ruhestand. Dabei wird angenommen, dass es sich nicht um eine einzige überkritische Störung handelt, sondern dass es aus der Summe von kleinen endogenen und exogenen Störungen und der Fähigkeit des Systems, diese zu verstärken - durch räumliche Kopplung - zur Selbstorganisation von komplexen räumlichen Ordnungszuständen kommt.

Ein chemisches Beispiel für ein anregbares Medium ist das Reaktionsgemisch nach Zhabotinsky-Belousov (48,49). In diesem System kann sich räumliche Organisation entwickeln, die sich im zweidimensionalen Raum als konzentrische oder spiralige Wellenausbreitung zeigt. Beim Uebergang zum räumlich homogenen System bleibt die Vergleichbarkeit zu den Amöben erhalten. Die Zhabotinsky-Reaktion zeigt in einer gerührten Lösung homogene Zustandsänderungen ebenso wie eine "geschüttelte Zellsuspension" von Dictyostelium. Dabei entsprechen den Farbumschlägen des Redoxindikators

die Oscillationen im "light-scattering".

Unter den biochemischen Oscillationen sind die Glykolyseoscillationen in Hefeextrakten das am besten untersuchte Beispiel (50). Die periodischen Aenderungen im NADH-Spiegel gehen auf die allosterischen Eigenschaften des Enzyms Phosphofruktokinase zurück. Bei den Oscillationen von Dictyostelium sind intrazelluläres und extrazelluläres Kompartiment - getrennt und verbunden durch die Zellmembran - in die Reaktionen mit einbezogen, anders als es bei der Zhabotinsky-Reaktion oder der Glykolyse, bei der die beteiligten Komponenten in löslicher Form im Cytoplasma vorliegen, der Fall ist. cAMP wird intrazellulär synthetisiert und von den Zellen ins Medium freigesetzt, von wo es wiederum seine eigene Synthese über Membranrezeptoren in einer Feedbackreaktion stimuliert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von cAMP, cGMP und Ca^{++} während der Zellkommunikation untersucht werden. Gleichzeitige Messungen des internen und externen cAMP-Spiegels sollten ein Bild geben über den zeitlichen Verlauf von Synthese und Transport von cAMP und bestätigten die Transmitterfunktion von cAMP im spontanen und induzierten Signalsystem. Ueber die Errechnung der Ausschüttungsrate konnte eine Aussage über die Pulsgrösse und die Amplifikation vermittelt werden. Inwieweit cGMP bei der Signalübermittlung beteiligt ist, sollte geprüft werden anhand von Messungen des cGMP-Verlaufs während spontaner und induzierter optischer Antworten. Versuche, mit externem Ca^{++} oder EGTA die spontanen optischen Aktivitäten der Zellen zu beeinflussen, sollten klären, ob noch weitere Transmitter beim Signalisieren in Frage kommen. Zum Abschluss sollte anhand von Messungen des Calciumspiegels untersucht werden, ob Ca^{++} in den nach cAMP-Stimulierung hervorgerufenen Antworten der chemotaktischen Orientierung und der Adenylcyclaseaktivierung beteiligt ist.

2. Methoden

2.1. Kulturmethoden

Zellen von Ax-2, einem axenisch wachsenden Stamm von Dictyostelium discoideum, werden für alle Messungen verwendet. Die Zellkultur wurde in einem mit Maltose (18g/l) supplementierten Pepton-Hefeextraktmedium nach Ashworth (51) auf einem rotierenden Schüttler (150 rpm) bei 23°C submers kultiviert.

Bei einer Dichte von ca. $3\text{-}8 \times 10^6$ Zellen/ml wurde das Kulturmedium entfernt (3 min bei 200xg, Christ IV KS Zentrifuge), die Zellen 3 mal in eisgekühltem Phosphat-Puffer (17 mM, pH 6) gewaschen (3 min bei 200xg), darin resuspendiert und diese auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellte Zellsuspension weitergeschüttelt. Mit dem Zeitpunkt der Mediumentfernung (= t_o) wird bei Dictyostelium ein neues Stadium des Lebenszyklus - die sog. Aggregationsphase - induziert. Die verschiedenen Stationen der Differenzierung, mit t_1, t_2 .... usw. bezeichnet, bedeuten 1,2 .... usw. Stunden nach t_o (18). Für die Messungen wurden meistens schnell differenzierende Klone von Ax-2 verwendet, nämlich 110, 206, 214, die in Suspension schon 4 bis 5 Stunden nach dem Wachstumsende mit spontanen optischen Aktivitäten beginnen (52).

2.2. Aufarbeitung der Zellsuspension zur optischen Messung

Aus der geschüttelten Zellsuspension (1×10^7 Zellen/ml) wurde zu verschiedenen Zeiten nach t_o ein Aliquot entnommen, 2 mal in PO_4-Puffer (17mM, pH 6) gewaschen (3 min bei 200xg), darin bei einer Zelldichte von $1\text{-}2 \times 10^8$ Zellen/ml aufgenommen und mindestens 10 min im Eisbad gekühlt. Diese dichte Zellsuspension dient zu den optischen Messungen.

Die Aggregationsfähigkeit der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert, indem Proben aus der Suspension auf Objektträger gebracht werden. Während in der frühen Differenzierungsphase, im sog. "vegetativen Stadium" (ca. t_o-t_3), die Zellen einzeln und unregelmässig geformt

bleiben, strecken sie sich in zunehmendem Masse im sog. "prä- und aggregationsreifen Stadium" (ca. t_4-t_6) und beginnen Zellaggregate auszubilden, aus denen schliesslich im sog. "Aggregationsstadium" ($\geq t_6$) langgestreckte Zellen und Zellstränge auswandern.

2.3. Messung von Lichtstreuungsänderungen

Um die Lichtstreuungsänderungen der Zellen zu registrieren (18), wurden 2-3 ml Zellsuspension (siehe 2.2.) vom Eisbad in eine Küvette von 1 cm Lichtweg übertragen. Der Boden der Küvette wurde mit einer schrägen Paraffinschicht ausgekleidet, die das Absetzen der Zellen verhindert. Die Zellsuspension wird konstant auf $22\pm1^{o}C$, bzw. $12\pm1^{o}C$ oder $3^{o}C$ gehalten und ist über zwei Kanülen mit einem Belüftungssystem verbunden, das Sauerstoff mit einer Durchflussrate von 24 ± 1 ml/min in die Suspension perlt. Dadurch werden die Zellen ständig durchmischt und eine grössere Aggregatbildung wird verhindert.

Die optische Dichte (Extinktion) dieser "dichten geschüttelten Zellsuspension" wird von einem Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II oder PM 6) registriert und der zeitliche Verlauf der Extinktion bei 405 nm von einem Schreiber aufgezeichnet (Siemens Kompensograph III oder W+W Recorder 1200) (19).

2.4. Präparation der "dichten geschüttelten Zellsuspension" zur cAMP-Bestimmung

2.4.1. "Schnelle Membranfiltrations-Silikonzentrifugationstechnik"

Die hohe Aktivität der Phosphodiesterasen, besonders der membrangebundenen (26), verlangt für cAMP-Messungen eine Technik, die eine sofortige Trennung der Zellen vom extrazellulären Medium garantiert, gleichzeitig verbunden mit einer schnellen Inaktivierung der cAMP-hydrolysierenden Enzyme. Um dieses zu erreichen, wurde eine Silikonzentrifugation mit einer Membranfiltration kombiniert (52), die

in (Fig. 1) graphisch dargestellt ist.

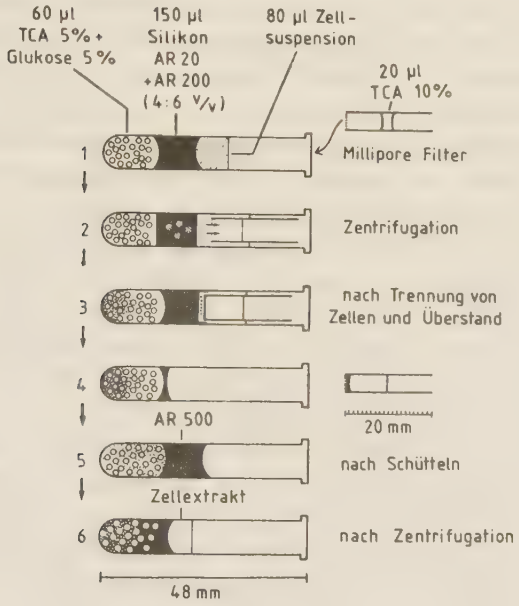

Fig. 1: Trennung der Zellen vom Ueberstand und Inaktivierung der cAMP-abbauenden Enzyme mit Hilfe einer schnellen "Membranfiltrations-Silikonzentrifugationstechnik".

Die einzelnen Schritte dieser Technik sind detailliert im Abschnitt 2.4.1. beschrieben.

In Mikrofuge-Teströhrchen (550 µl aus Polypropylene, von Milian (PAT-22) oder Microfuge-testtubes von Beckman) wurde ein TCA-Glucosegemisch pipettiert (60 µl, 10%ige TCA und 10%ige Glucose in H_2O) und mit Glasperlen (HCl-gewaschen, 0.5 mm Durchmesser von Braun Melsungen) bis ca. 2 mm unter den Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt. Darüber wurde ein Silikongemisch gegeben (AR 20 (4 Teile) und AR 200 (6 Teile) von Wacker Chemie, München). In ein, an einem Ende mit einem Filter verschlossenen, (Polyvic-Filter, 0.6 µm Poren-

grösse von Millipore (BDWP 15 000); Klebstoff: I.S. - 12 Cyanoacrylate Adhesive von LOCTITE [R]) Röhrchen (aus Polyethylene, 2.92 innerer x 3.72 mm äusserer Durchmesser von Intramedic [R] (PE 330 (7471)) wurde vorsichtig (unter Vermeidung jeglichen Kontaktes mit dem Filter) TCA pipettiert (20 µl, 20%ige TCA in H_2O).

Zu den gewünschten Messpunkten für die cAMP-Bestimmung wurden sehr vorsichtig (möglichst ohne den Extinktionsverlauf zu stören) aus der sich in der Küvette befindlichen Zellsuspension 80 µl Proben entnommen und auf das Silikongemisch im Teströhrchen pipettiert, schnell das Filter verschlossene Röhrchen darin eingeführt und sofort abzentrifugiert (7 sec bei 10 000xg an einer Beckman-Microfuge [B]). Innerhalb weniger als 2 sec wurde dadurch das extrazelluläre Medium (= Ueberstand) vom Zellsediment getrennt.

Die Zellen wanderten durch das Silikongemisch, wurden durch die Glasperlen verteilt, wobei die Phosphodiesterasen durch die anwesende TCA inaktiviert wurden. Der Ueberstand war bei der Zentrifugation durch den Millipore-Filter in das eingeführte Röhrchen eingedrungen und die darin haftende TCA stoppte die extrazelluläre PDE-Aktivität. Das Filterröhrchen selbst wurde beim Zentrifugieren ein Stück weit ins Silikon gestossen, wodurch der Filter verschlossen und ein Zurücklaufen des Ueberstandes unmöglich wurde. Dadurch konnte das Röhrchen herausgezogen, sein Inhalt an einem geeichten Masstab gemessen und dann weiterverarbeitet werden.

Aus dem das Sediment enthaltende Mikrofugen-Teströhrchen wurde der restliche Ueberstand und das Silikongemisch so weit wie möglich abgesaugt und durch ein Silikon höherer Dichte ersetzt (AR 500 von Wacker Chemie, München). Unter energischem Mixen (Vortex, höchste Stufe für 2 min) wurden die Zellen zwischen den Glasperlen verteilt. Beim anschliessenden Zentrifugieren (2 min bei 10 000xg an einer Beckman-Microfuge [B]) verblieben Zellreste und Glasperlen am Boden des Röhrchens, während der klare Zellextrakt

hochgestiegen war und oben auf der dichten Silikonschicht lag und zur weiteren Aufarbeitung abpipettiert werden konnte. Der Zellvolumenanteil in der Zellsuspension wurde mit einem Hämatokritröhrchen bestimmt (bei 3500 rpm an einer Hettich Universal II).

Wurden die so gewonnenen "intra- wie auch extrazellulären Proben" nicht sofort weiterverarbeitet, wurden sie bei -70°C aufbewahrt.

2.4.2. Aufarbeitung der "intra- und extrazellulären Proben" zur cAMP-Bestimmung

50 µl Portionen der nach (2.4.1.) gewonnenen "intra- und extrazellulären Proben" wurden mit 6 µl 1 n HCl angesäuert und zur Entfernung der TCA 5 mal mit Diäthyläther (je 150 µl) extrahiert. Um den für den cAMP-Test notwendigen pH-Wert zu erreichen, wurden je 50 µl der Aether extrahierten Proben mit 22-25 µl Veronal-Acetat-Lösung (53) versetzt, so dass das Probengemisch schliesslich einen Michaelis-Puffer mit pH 4 enthält. Jede einzelne Probe wurde mit pH-Teststäbchen genau auf pH 4 eingestellt. Die so behandelten Proben konnten jetzt zur cAMP-Bestimmung in den Gilman-Test oder Radioimmunoassay eingesetzt werden.

2.5. Bestimmung des cAMP nach dem Gilmantest

Beim cAMP-Test nach Gilman (54) wird die Verdrängung von ^{3}H-markiertem durch unmarkiertes cAMP an einen cAMP-abhängigen Proteinkinasekomplex gemessen.

Dabei bindet das Nukleotid spezifisch an ein Bindeprotein und nur dieser Teil des Enzymkomplexes (55) ist für den Gilmantest relevant. Durch Adsorption an einen Membranfilter kann der gebundene Nucleotid-Proteinkomplex isoliert werden (56).

Die unbekannte cAMP-Menge in den Proben kann quantitativ über eine Eichkurve bestimmt werden. In dieser nimmt durch die kompetitive Bindung von ^{3}H-markiertem cAMP konstanter Menge und unmarkierten cAMP-Standards steigender Menge das total gebundene ^{3}H-cAMP linear ab. Die cAMP-Menge

in der unbekannten Probe kann dann direkt anhand der gebundenen Radioaktivität (= cpm) aus der Eichkurve abgelesen werden (56,54) und unter Einbeziehung der Verdünnungsschritte die molare cAMP-Konzentration errechnet werden.

Bei einigen Versuchen wurde der von Boehringer angebotene cAMP-Testkit verwendet (Radioisotopenverdünnungstest mit A-3:5MP-bindendem Protein von Boehringer, Mannheim; Nr. 15 289). Die dabei notwendigen Bedingungen wurden ausführlich beschrieben (13).

Bei den anderen Versuchen wurde das zur cAMP-Bestimmung notwendige Bindeprotein nach Vorschrift von Gilman (54,57) isoliert und in 1 ml Portionen bei -70°C aufbewahrt.

2.5.1. Testansatz- und bedingungen

2.5.1.1. Testansatz siehe Tabelle I

2.5.1.2. Lösungen des Testansatzes

I. Na-Acetatpuffer: 0.2 M, pH 4

II. cAMP-Lösung : in H_2O bidest., $4x10^{-7}$M

III. ^{3}H-cAMP-Lösung : 27 Ci/mMol cAMP; 1 mCi/ml (Amersham); verdünnt in H_2O bidest. bis 0.8 pMole ^{3}H-cAMP/20 µl.

IV. "Probe mit unbekanntem cAMP-Gehalt": nach (2.4.1 und 2.4.2) aufgearbeitet, wurde direkt im Test eingesetzt.

V. Bindeprotein : die bei -70°C eingefrorenen 1 ml Portionen wurden mit 4 ml 5mM PO_4-Puffer (pH 7, mit KOH titriert) verdünnt und je 20 µl pro Messpunkt im Test eingesetzt.

VI. "Intrazelluläre Störprobe": Portionen von je 50 µl eines TCA-Glucose-Gemisches (10%ige TCA und 10%ige Glucose in H_2O)

Tabelle I

	1) H_2O bidest	2) Na-Acetat-puffer	3) cAMP	4) ^{3}H-cAMP	5) Störprobe a) intrazelluläre b) extrazelluläre	6) "unbekannte cAMP-Probe" a) intrazelluläre b) extrazelluläre	7) Bindeprotein
Störeichkurve							
a) intrazellulär							
b) extrazellulär							
Leerwert	a) 120 ul b) 110 ul	50 ul	-	20 ul	a) 10 ul b) 20 ul	a) - b) -	-
0 Standard	100 90	50	-	20	10 20	- -	20 ul
2 pMol - "	95 85	50	5 ul	20	10 20	- -	20
4 pMol - "	90 80	50	10	20	10 20	- -	20
8 pMol - "	80 70	50	20	20	10 20	- -	20
12 pMol - "	70 60	50	30	20	10 20	- -	20
"unbekannte cAMP-Probe"							
a) intrazellulär	a) 100 ul b) 90 ul	50 ul	-	20 ul	a) - b) -	a) 10 ul b) 20 ul	20 ul
b) extrazellulär							

Der Test wurde bei allen Versuchen in 200 ul Gesamtvolumen durchgeführt.

werden mit 6 µl 1 N HCl versetzt und 5 mal mit je 150 µl Diäthyläther extrahiert. 50 µl aus diesem Gemisch wurden mit 20 µl Veronal-Acetatlösung (53) auf pH 4 gebracht und dann als intrazelluläre Störprobe (je 10 µl) im Gilmantest bei "intrazellulären Störeichkurven" eingesetzt.

VII. "Extrazelluläre Störprobe":
Zu Portionen von je 50 µl PO_4-Puffer (17 mM, pH 6) wurden 20 µl 10%iger TCA gegeben, mit 6 µl 1 N HCl versetzt und 5 mal mit je 150 µl Diäthyläther extrahiert. 50 µl aus diesem Gemisch wurden mit 20 µl Veronal-Acetatlösung (53) auf pH 4 gebracht und diese so aufgearbeitete Lösung als "extrazelluläre Störprobe" (je 20 µl) im Gilmantest bei "extrazellulären Störeichkurven" eingesetzt.

2.5.1.3. Testdurchführung

Die im Testansatz (2.5.1.1.) beschriebenen Lösungen wurden in der Reihenfolge 1-7 bei 0°C pipettiert, vorsichtig gemischt und im Eisbad gekühlt. Die Zugabe von Bindeprotein startet die Reaktion; nach 100 min Inkubation wurde sie durch Zugabe von ca. 1 ml PO_4-Puffer (5 mM, pH 7) gestoppt.

Durch einen puffergetränkten Millipore-Filter (Millipore ^{R} -Filter, HA WP 25 000, 0.45 µm Porengrösse, 25 mm ø, weiss, glatt, aus Celluloseacetat) wurde der Ansatz abgesaugt und mit ca. 10 ml PO_4-Puffer (5 mM, pH 7) nachgewaschen.

Zur Messung der gebundenen Radioaktivität (= cpm) wurde der trockene Filter in 1 ml Aethylenglycolmonomethyläther aufgelöst und in 10 ml Scintillationslösung (200 ml (Methoxy)-äthanol mit 800 ml einer Lösung von 8g 2,5-Diphenyloxazol in 1 l Toluol gemischt oder Insta-Gel von Packard) in einem Liquid-Scintillator (Intertechnique oder Packard TRI-CARB) gezählt.

2.5.1.4. Testbedingungen

Alle Testansätze werden 100 min inkubiert; dieser Zeitraum (bzw. schon 60 min) genügt nach Gilman (54) zur Erreichung des Gleichgewichts für die cAMP-Bindung.

Temperaturerhöhung ($\geq 20^{\circ}C$), wiederholtes Einfrieren und Auftauen und vor allem starkes Schütteln führen zur Denaturierung des Bindeproteins.

Bei einem Inkubationsvolumen von 200 µl wird eine Sensitivität von 0.2 pMole cAMP / unbekannte Probe erreicht und stellt damit die Grenze der Messgenauigkeit in den Versuchen dar (54,58).

Die im Test eingesetzte ^{3}H-cAMP-Konzentration von 40 nM entspricht Sättigungsbedingungen für cAMP und der Effekt der cAMP-Standardlösungen kann als lineare Abnahme des total gebundenen ^{3}H-cAMP gemessen werden (56,54).

Die grosse pH-Empfindlichkeit des Bindeproteins verlangt eine genaue Einstellung der Proben auf pH 4 (53) (cAMP-Bindungskonstante von 10-20 nM bei pH 6 und 2-3 nM bei pH 4 (54)).

Störungen der cAMP-Bindung und damit Abweichungen vom linearen Standardeichdiagramm (13) treten jedoch vor allem durch Reste an TCA, Aether, Silikon usw. auf, die nach Aufarbeitung in den "intra- und extrazellulären Proben" (2.4.2.) noch in diesen verbleiben. Um solche Störeffekte zu umgehen, wurde das cAMP-Eichdiagramm in Gegenwart der "störenden Substanzen" (als "intra- oder extrazelluläre Störprobe" bezeichnet) durchgeführt und die Messung der cAMP-Menge in der "unbekannten intra- oder extrazellulären Probe" auf die entsprechende "Störeichkurve" bezogen.

Ein Vergleich einer sog. "Standardeichkurve" (Testansatz ohne 5+6 siehe 2.5.1.1.) mit sog. "Störeichkurven" (Testansatz mit Nr. 5a) oder b), d.h. "intra- oder extrazellulärer Störprobe") zeigt den unterschiedlichen Diagrammverlauf (siehe Fig. 2).

Dabei können die "unbekannten, extrazellulären Proben" - werden sie (= cpm) an einer "Standardeichkurve"

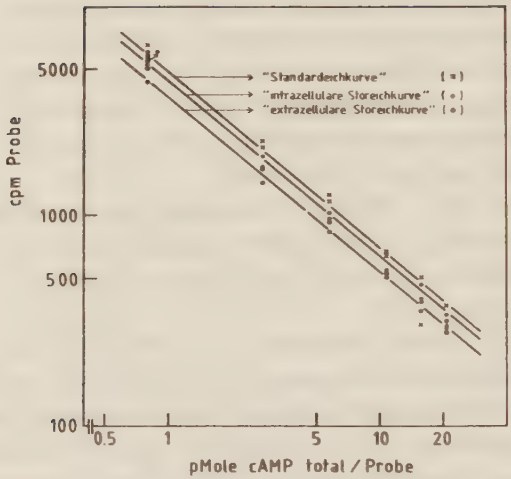

Fig. 2: Standard- und Störeichkurven.

Testansatz: 50 ul Na-Acetatpuffer (0.2 M, pH 4), 5-50 ul cAMP-Standards (4x10^{-7}M), 20 ul ^{3}HcAMP (0.8 pMole, 27 mCi/mM), 20 ul Bindeprotein, in den Störeichkurven 10 ul intra- bzw. 20 ul extrazelluläre Störprobe, H_2O bidest. bis auf Gesamtvolumen von 200 ul. Aufgetragen wurde die gebundene Radioaktivität (log cpm) gegen log pMole cAMP total/Probe.

abgelesen - in ihren cAMP-Werten bis max. um den Faktor 1.4 zu hoch liegen, die "unbekannten intrazellulären Proben" resp. um den Faktor 1.1, was für letztere im Bereich der Messgenauigkeit liegt. Als Kontrolle - um etwaige aussergewöhnliche Abweichungen auszuschliessen - werden 2 Standards (0-, und 10 pMol-Standard) ohne Störprobe je Testansatz mitgemessen und mit den Störstandards verglichen.

2.5.2. Kontrollversuche zur "Störeichkurve"

2.5.2.1. "Recovery-Kontrolle" an nichtzellulären Proben

Es sollte geprüft werden, ob die Probenaufarbeitung zu einem Verlust von cAMP führt und damit die in

einer bekannten Probe vorhandene cAMP-Menge nicht mehr quantitativ wiedergefunden werden kann.

Dazu wurde eine $1x10^{-6}$M cAMP-Lösung mit TCA versetzt und nach Aetherextraktion in Michaelis-Puffer auf pH 4 eingestellt, - gleiche Mischungsverhältnisse und Aufarbeitung wie "extrazelluläre Störprobe", siehe 2.5.1.2./ VII. -, so dass das Testgemisch schliesslich 4.35 pMole cAMP/10/ul enthielt. Die Messung des cAMP in dieser "nichtzellulären Recovery-Probe" anhand einer "extrazellulären Störeichkurve" (mit 10/ul Störprobe) ergab sehr gute Uebereinstimmung mit den erwarteten Werten (die Abweichung betrug im Durchschnitt ± 5.7%).

Als weiteres wurde untersucht, ob bei Erhöhung der Störprobenmenge auf das Zweifache beim Test auf Wiederfindung die Proportionalität erhalten bleibt. Eine wie oben behandelte "nichtzelluläre Recovery-Probe" mit 8.5 pMolen cAMP/20/ul ergab die quantitative Wiederfindung von 8.5 pMolen an einer "extrazellulären Störeichkurve (mit 20/ul Störprobe) mit einer durchschnittlichen Abweichung von ± 3.14%.

2.5.2.2. "Recovery-Kontrolle" an zellulären Proben

Um unspezifische Effekte auf die cAMP-Bindung ausschliessen zu können, - eventuell hervorgerufen durch in den Proben nach der Aufarbeitung verbleibende zelluläre Komponenten -, wurden Tracer-Mengen von unmarkiertem cAMP zu "intrazellulären Proben" (aus Versuchen) gegeben. Nach einer ersten cAMP-Bestimmung dieser "intrazellulären Proben" anhand einer "Störeichkurve" wurde bei einem neuen cAMP-Testansatz in jede Probe (10/ul) eine 8 pMole cAMP enthaltende Lösung zugegeben. Die Messung der Gesamt-cAMP Menge (= Probe + Tracer) in dieser "Recovery-Nachbestimmungsprobe" ergab eine durchschnittliche Abweichung von ± 7.1% vom Erwartungswert, was innerhalb der Messgenauigkeit liegt.

2.5.2.3. Nachbestimmung von zellulären Proben

Als weitere Kontrolle sollten zelluläre Proben nach einer ersten cAMP-Messung nach 1-monatiger Lagerung (-70°C) von Bindeprotein und Proben in einem zweiten cAMP-Test einer Nachbestimmung unterzogen werden. Bei den nachgetesteten "intrazellulären Proben" anhand einer "intrazellulären Störeichkurve" wurde eine Abweichung von durchschnittlich ± 25% zur ersten Messung gefunden.

2.5.2.4. Phosphodiesterase-Kontrolle

Durch diese Kontrolle sollte der cAMP-Test auf Spezifität geprüft werden, obwohl nach Gilman (54) das cAMP-Bindeprotein alleine schon eine hohe Spezifität für cAMP besitzt. Andere Komponenten, bes. zyklische Nukleotide und das in den Zellen in hohen Konzentrationen vorhandene ATP interferiert im Test nicht oder nur wenig. Die Hydrolysierbarkeit des cAMP in der Zellsuspension durch cAMP-PDE sollte diese Annahme bestätigen.

Bei der Testdurchführung wurden je 10 µl "intrazelluläre Probe", deren cAMP-Gehalt zweimal in voneinander unabhängigen cAMP-Bestimmungen geprüft worden war, auf pH 7 gebracht (mit 1 N NaOH) und bei 36°C 30 min mit 1 µl PDE (Rinderherz Phosphodiesterase von Boehringer, Mannheim, 0.15 units/ml) inkubiert. Nach dem Denaturieren der PDE (bei 95°C, 5 min) wurde die Probe wieder auf pH 4 titriert (mit 1 N HCl) und im Gilmantest eingesetzt.

Der cAMP-Gehalt in den "intrazellulären Proben" lag zwischen 2.35 - 21.5 pMolen cAMP/10 µl; nach der Hydrolyse enthielten sie noch 0.25 - 1.25 pMole cAMP/10 µl. Damit wurden durchschnittlich 5.4% des cAMP in den Proben entweder nicht hydrolysiert oder die Anwesenheit der "PDE-Probe" im Gilmantest hat auf die cAMP-Bindung einen leichten unspezifischen Störeffekt, der jedoch im Bereich der Messfehlergrenze liegt.

Dieser Störeffekt wurde in einer weiteren Kontrolle untersucht. Zu 0-Standardproben (sie enthalten

ausser ^{3}H-cAMP kein weiteres unmarkiertes cAMP) wurden je 10/ul "nichtzelluläre PDE-Störproben" gegeben. (Ein Gemisch aus 50/ul PO_4-Puffer (pH 6, 17 mM), 20/ul 10%ige TCA, 6/ul 1 N HCl wurde nach Aetherextraktion in Michaelis-Puffer auf pH 4 eingestellt und ansschliessend PDE-verdaut (siehe oben)).

Ein Vergleich einer "PDE-O-Standardprobe" mit "O-Standardstörprobe" (gleiche Störprobenaufarbeitung, jedoch ohne PDE-Hydrolyse) zeigte, dass im "PDE-Standard" die totale gebundene Radioakt vität (= cpm) leicht erhöht ist (im Durchschnitt um 11.6%).

2.6. cAMP- und cGMP-Bestimmung nach einem Radioimmunoassay

Für einen Teil der Versuche wurde die cAMP, bzw. alle cGMP-Bestimmungen nach einem Radioimmunoassay (59) durchgeführt.

Cailla et al. (60) haben einen sensitiven spezifischen und reproduzierbaren Assay entwickelt, der es ermöglicht, noch 10^{-15} Mole (bzw. 10^{-16} Mole) cAMP in einer Probe zu entdecken; dabei bindet das in ein 2'-O-Bernsteinsäurederivat überführte cAMP-Molekül (SCAMP) an einen Antikörper, der mit Hilfe eines cAMP-Bernsteinsäurealbumins als Immunogen gewonnen wurde. Dieses SCAMP kompetiert dann gegen einen ^{125}J-Standard (2'-O-Bernsteinsäure-cAMP-Tyrosin-Methylester, jodiniert durch ^{125}J = ^{125}J SCAMPTME). Bei diesem Test verbleibt jedoch die Probe in hoher Succinatlösung. Darum wurde hier eine Abwandlung nach Harper und Brooker (61) verwendet, wo anstelle der Succinylierung eine Acetylierung der zu testenden Proben tritt. Im Testansatz wird jedoch weiterhin ^{125}J SCAMPTME verwendet (anti-cAMP und ^{125}J SCAMPTME von Cailla, Marseille).

2.6.1. Testansatz- und durchführung für cAMP

2.6.1.1. Testansatz siehe Tabelle II

Tabelle II

Dieser Testansatz ergibt für alle Messpunkte ein Probenvolumen von 100 µl.

Störeichkurve a) intrazelluläre b) extrazelluläre	cAMP			PO_4-Puffer		intrazelluläre Störprobe		extrazelluläre Störprobe		unbekannte cAMP-Probe intrazellulär	unbekannte cAMP-Probe extrazellulär
femtomol-Standard		a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)		
0	-	0	0 µl	50	50 µl	50 µl	-	-	50 µl		
3	10^{-9} M	-	3	-	47	-	-	-	50		
10	10^{-9} M	10	10	40	40	50	-	-	50		
30	10^{-9} M	30	30	20	20	50	-	-	50		
100	10^{-8} M	10	10	40	40	50	-	-	50		
250	10^{-8} M	25	25	25	25	50	-	-	50		
500	10^{-8} M	50	50	0	0	50	-	-	50		
1 000	10^{-7} M	10	10	40	40	50	-	-	50		
3 000	10^{-7} M	30	30	20	20	50	-	-	50		
10 000	10^{-6} M	10	-	40	-	50	-	-	-		
"unbekannte cAMP-Probe" a) intrazellulär b) extrazellulär				a) 98 µl b) 80 µl						a) 2 µl b) -	a) - b) 20 µl

2.6.1.2. Herstellung der "unbekannten cAMP-Proben"

Die "unbekannten cAMP-Proben" wurden aus der Zellsuspension in der Küvette mit Hilfe der "schnellen Membranfiltration-Silikonzentrifugation" gewonnen (siehe 2.4.1.) und in gleicher Weise aufgearbeitet wie die Proben für die cAMP-Bestimmung nach Gilman ("intrazelluläre Proben" siehe: 2.5.1.2./VI; "extrazelluläre Proben" siehe: 2.5.1.2./VII.).

2.6.1.3. Herstellung der "intra- und extrazellulären Störproben"

Es wurde eine Zellsuspension vorbereitet, die den Bedingungen des zu testenden Versuches entsprach (gleiche Zellzahl und Zelldichte). Aus der Küvette wurden Proben entnommen und in gleicher Weise wie im Versuch Zellextrakte und Ueberstände gewonnen ("schnelle Membranfiltration-Silikonzentrifugation" und Aetherextraktion siehe: 2.4.1. und 2.4.2.).

Um den Extrakt als "intrazelluläre Störprobe" einsetzen zu können, wurden 20/ul davon mit 470/ul PO_4-Puffer und 10/ul PDE (Rinderherz PDE von Boehringer, Mannheim, 0.15 units/ml) 1 Stunde bei 36°C inkubiert, anschliessend 5 min gekocht und dann je 50/ul dieses Gemisches als Störprobe in die "intrazelluläre Störeichkurve eingesetzt. Dadurch sind sämtliche Störeffekte eventuell hervorgerufen durch TCA, Aether, Silikon oder unspezifische zelluläre Komponenten von vornherein in den Testansatz mit einbezogen (62,63).

Um den Ueberstand als "extrazelluläre Störprobe" verwenden zu können, wurden 200/ul nach obiger Präparation mit 290/ul PO_4-Puffer und 10/ul PDE gemischt, 1 Stunde bei 36°C inkubiert und nach 5 min Kochen je 50/ul Portionen als Störprobe in der "extrazellulären Störeichkurve" verwendet.

2.6.1.4. Testdurchführung

Der Testansatz - insgesamt je 100 µl des Störeichstandards und unbekannten cAMP-Proben - kann nun acetyliert werden durch jeweilige Zugabe von zuerst 10 µl Triäthylamin und dann 5 µl Essigsäureanhydrid. Dabei wurden die in Eis aufbewahrten Proben eine nach der anderen acetyliert. Anschliessend blieb das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur stehen und wurde dann 1:7 oder 1:5 mit Na-Acetatpuffer (0.1 N, pH 5.5 mit 0.06% NaN_3) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden von jedem Messwert (Standard oder Probe) je 75 µl in den Radioimmunoassay (Dreifachbestimmung) eingesetzt.

Der Assay wurde gestartet durch Zusammengeben von 75 µl des Standard- oder Probelösungsgemisch mit 150 µl anti-cAMP und 75 µl ^{125}J SCAMPTME (ca. 10 000 cpm). Dieses Gemisch wurde vorsichtig umgeschüttelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml, ständig gerührter Norit-BSA-Suspension (2 mg/ml Norit A (Serva 30890), 2,5 mg/ml BSA (Sigma) in 100 mM K-PO_4-Puffer (pH 6.3), 0.02% NaN_3) und anschliessender Inkubation (20 min) in Eis wurde die Reaktion beendet. Nach Zentrifugation (2 min, 8000 x g in Eppendorf Zentrifuge 3200) kann die Radioaktivität des cAMP-Antikörperkomplexes im Ueberstand gemessen werden (je 500 µl Ueberstand in 5 ml Insta-Gel (Packard), 10 min Zählung im Scintillationszähler (Packard TRI-CARB)). Die nichtgebundenen Nukleotide adsorbieren an die Aktivkohle und verbleiben damit im Sediment.

Für die Standards kann eine Eichkurve erstellt werden (cpm gegen femtomole cAMP oder % ^{125}J gebunden gegen femtomole cAMP) (siehe Fig. Nr. 3), das cAMP in der unbekannten Probe direkt aus ihr abgelesen werden und nach Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren (die während der Aufarbeitung der intra- oder extrazellulären Proben aufgetreten sind) die molare cAMP-Konzentration für jeden Messpunkt des Versuches berechnet werden.

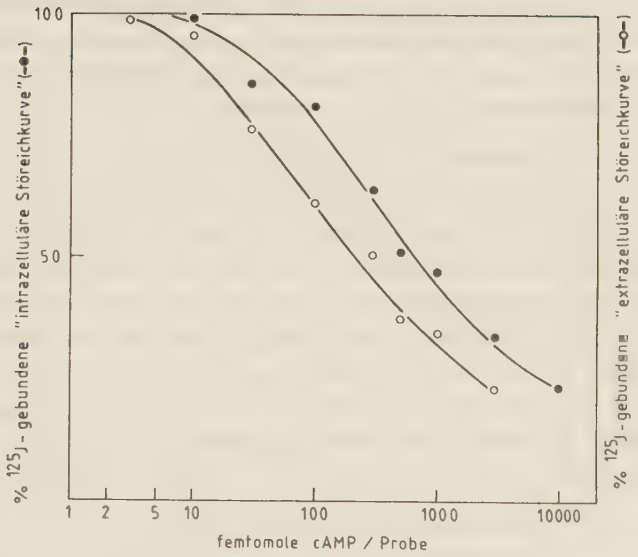

Fig. 3: "Intra-" und "extrazelluläre Störeichkurven" für die cAMP-Bestimmung nach einem Radioimmunoassay. Testansatz- und durchführung siehe 2.6.1.1. - 2.6.1.4. Aufgetragen wurde % gebundenes ^{125}J gegen log femtomole cAMP/Probe. 100% ist definiert als die gemessene spezifische Radioaktivität im cAMP-Assay in Abwesenheit von zugefügtem kompetierendem nicht radioaktivem cAMP.

2.6.2. cGMP-Bestimmung nach einem Radioimmunoassay

Bei der cGMP-Bestimmung wird in allen Punkten analog zum cAMP-Test gearbeitet (63). Man verwendet jedoch ^{125}J SGMPTME und einen anti-cGMP-Albumin Antikörper.

2.7. Ermittlung der cAMP-Ausschüttungsrate- und Pulsgrösse durch Phosphodiesterasemessungen

Für einen Teil der Versuche wurden direkt am Schluss eines Experimentes Proben entnommen, an denen die Hydrolyseaktivität der extrazellulären und membrangebundenen cAMP-Phosphodiesterase bestimmt wurde (44).

Dadurch ist es zum einen möglich, die Pulsgrösse zu errechnen, d.h. die von einer Zelle ausgeschüttete Molekülzahl cAMP als Antwort auf einen externen Stimulus, und zum anderen unter Einbeziehung des cAMP im Ueberstand die cAMP-Transportrate zu ermitteln.

2.7.1. Testansatz- und durchführung

Zu 50/ul Zellsuspension (2 x 10^8 Zellen/ml) wurde bei 22°C, bzw. 13°C 500/ul "radioaktiver Mix" unter starkem Schütteln gegeben ("Radioaktiver Mix": 20/ul ^{3}H-cAMP (37 pMole ^{3}H-cAMP/20/ul; 25 Ci/mmol von Amersham), 50/ul 1 x 10^{-5}M cAMP, 430/ul PO_4-Puffer (17 mM, pH 6)). Nach 5, 15 und 30 sec wurden jeweils 150/ul vom Probengemisch entnommen und die Reaktion in 10/ul vorgelegter TCA (50%ig) gestoppt. Die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C aufbewahrt.

2.7.2. Chromatographie der PDE-Proben

Je 60/ul Portionen der Proben wurden mit 10/ul "N-Mix" versetzt ("N-Mix": Adenosin, 5'AMP, cAMP je 10 mM) und dieses Gemisch anhand einer Papierchromatographie getrennt (Whatman No. 1 Papier; Laufmittel: 95% Aethanol + 1 M Ammoniumacetat (70:30 v/v); Laufzeit: über Nacht). Die Radioaktivität der Flecken (= cpm) kann in einem Liquid-Scintillator (Intertechnique oder Packard TRI-CARB) in 5 ml Insta-Gel (Packard) gemessen werden.

2.7.3. Berechnung der Hydrolyserate

Aus der gefundenen Radioaktivität konnte die Hydrolyse des cAMP/min im Ansatz ermittelt werden:

$$\% \text{ Hydrolyse}_{(t_{1\ldots n}} = \frac{\sum_{t=1}^{n} \text{cpm (5'AMP+Adenosin)} \times 100}{\sum_{t=1}^{n} \text{cpm (cAMP+5'AMP+Adenosin)}} \quad ;$$

über eine Ausgleichsgerade ergibt sich daraus - unter Einbeziehung des Ansatzes - die Hydrolyserate (Hydrolyse von /uMcAMP/L /2 x 10^{11} Zellen/min bei einem Ansatz von 537 pMolen cAMP/550/ul/1 x 10^7 Zellen).

Durch Umformung der Hill-Gleichung (64) nach:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{0.5}}{S}\right)^{n_H}} \times f$$

wobei: $K_{0.5}$ = 0.648 /uM,
n_H = 0.89
f = 1.68

und unter der Annahme, dass bei einer Substratkonzentration (=cAMP) von 1 /uM $\frac{v}{V_{max}}$ = 1 sei, wurde das Diagramm $\frac{v}{V_{max}}$ gegen S (/uM cAMP) erstellt.

2.8. ^{45}Ca-Vormarkierung von Zellsuspensionen für ^{45}Ca-Release-Messungen

Um den spontanen ^{45}Ca-Release oder die ^{45}Ca-Aenderung nach cAMP-Pulsen im Ueberstand zu messen, wurden die Zellen mit radioaktivem Ca markiert (65).

Aggregationsreife Zellen (t_{5-8}, Ax-2-10) wurden 2 mal in Tricin-Puffer (10mM, pH 7) gewaschen, darin bei einer Zelldichte von 5 x 10^7 Zellen/ml (5% Zellsedimentanteil) resuspendiert und weitergeschüttelt. Anschliessend wurde diese Zellsuspension 30 min mit $^{45}CaCl_2$ inkubiert.

Bei den spontanen Releaseversuchen wurde 1 ml Zellsuspension mit 4.47/uCi ^{45}Ca inkubiert; die ^{45}Ca-Konzentration in der Zellsuspension betrug 3 x 10^{-6}M ($^{45}CaCl_2$: 0.559 mCi/ml, 42/ug/ml, Amersham). Bei den Experimenten über ^{45}Ca-Aenderungen nach cAMP-Pulsen wurde mit 0.53 mCi/ml, 42/ug/ml $^{45}CaCl_2$ (von Amersham) inkubiert. Das angebotene ^{45}Ca betrug 1.06 - 4.41/uCi/ml Zellsuspension; die ^{45}Ca-Konzentration in der Zellsuspension lag zwischen 0.76 - 3/uM.

Zur Entfernung des nicht aufgenommenen ^{45}Ca wurde die Zellsuspension 4-5 mal in Tricin-Ca-Puffer (10mM, pH 7, 1mM $CaCl_2$) gewaschen, beim 5., bzw. 6. Waschen nur

in Tricin-Puffer (10mM, pH 7) und in diesem bei 5 x 10^7 Zellen/ml resuspendiert, danach weitergeschüttelt. Bei den spontanen ^{45}Ca-Releaseversuchen wurde vor dem Weiterschütteln ein Teil der Zellsuspension mit 1 x 10^{-3}M EDTA (Endkonzentration) versetzt, der andere blieb unbehandelt.

Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 100 oder 150 µl Zellsuspension entnommen, 5 sec abzentrifugiert (bei 8000 x g, Eppendorf Zentrifuge 3200) und der Ueberstand sofort abpipettiert. Ein Aliquot des Ueberstandes wurde in 5 ml Scintillationsflüssigkeit (Triton-Toluolscintillator: 10 g PPO, 0.5 l Triton, 1 l Toluol) gegeben und die Radioaktivität in einem Liquid-Scintillationszähler (Intertechnique) gemessen. Für die Versuche, bei denen die Abnahme des ^{45}Ca-labels im Sediment gemessen werden wollte, wurde das Zellsediment mit 50 µl Tissue-Solubilizer versetzt (NCS*, Amersham/Searle (190620)), gut geschüttelt und 60 min bei 60°C unter wiederholtem Schütteln inkubiert, bis das Gemisch klar wurde. Anschliessend wurde zu den aufgelösten Sedimenten 1 ml Scintillator gegeben (5 g PPO in 1 L Toluol), vorsichtig durchmischt, danach die Probe mit 4 ml Toluolscintillator gezählt.

2.9. <u>^{45}Ca-Influx-Messungen nach cAMP- und 5'AMP-Pulsen an nicht vormarkierten Zellen bei 22±1°C und 13±1°C</u>.

Ax-2-Zellen (Klon 206) wurden 3 bis 5 Stunden nach t_o 2 bis 3 mal in Tricin-Puffer (15mM, pH 7) gewaschen, darin resuspendiert und mindestens 10 min im Eisbad gekühlt.

Diese Zellsuspension (1 - 2 x 10^8 Zellen/ml, 2.5 ml Gesamtvolumen) wurde zu den Lichtstreuungsmessungen (18) verwendet und die Versuche bei 13±1°C oder 23±1°C durchgeführt (65). Für die ^{45}Ca-Influx-Messungen wurde in die Zellsuspension 0.02 µCi/1 x 10^8 Zellen/ml radioaktives Ca gegeben ($^{45}CaCl_2$: 32 µg Ca/mCi, Amersham) und nach durch-

schnittlich 15 min Wartezeit (zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen intra- und extrazellulärem ^{45}Ca) der Versuch gestartet.

Zu den Messpunkten wurden 120 µl Probe aus der Zellsuspension entnommen und das Zellsediment sofort durch Zentrifugation (10 sec bei 10 000 x g an einer Beckman-Microfuge ^{B}) über Silikonlayer (AR 20 und AR 200, 4:6, v/v, Wacker Chemie, München) vom Ueberstand abgetrennt. Der oberhalb des Silikonlayers verbleibende Ueberstand (= extrazelluläres Ca) kann direkt in 5 ml Insta-Gel (Packard) an einem Liquid-Scintillator (Packard TRI-CARB) auf seine Radioaktivität geprüft werden (je 75 µl Ueberstandsprobe).

Das sich im Sediment am Boden des Silikonlayers befindliche zelluläre ^{45}Ca muss zuerst extrahiert werden. Nach Abheben des restlichen Ueberstandes und 2 maligem Waschen (je 300 µl H_2O bidest) der Silikonoberfläche zur Entfernung von extrazellulären ^{45}Ca-Resten wurde das Silikon so weit wie möglich abgesaugt. Durch Zugabe von 300 µl HCl (1N), kräftigem Schütteln (Vortex, höchste Stufe für 2 min) kann der klare Extrakt nach Zentrifugation (2 min, 10 000 x g an Beckman-Microfuge ^{B}) in 5 ml Insta-Gel an einem Scintillationszähler auf seine Radioaktivität geprüft werden (je 100 µl zelluläre Proben).

Das Zellvolumen im Sediment wurde durch Hämatokrit bestimmt (bei 3500 rpm an einer Hettich Universal II). Anhand von Versuchen mit ^{14}C-Inulin (das nicht in die Zellen aufgenommen wird) ergab sich eine Ueberstandskontamination im Sediment von 30% des Sedimentvolumens. Um diesen Wert wurden die Sedimentwerte korrigiert.

3. Ergebnisse

3.1. Verlauf des cAMP-Spiegels bei spontanen Oscillationen

3.1.1. Intra- und extrazelluläre cAMP-Oscillationen bei spontanen Spike-artigen Lichtstreuungsänderungen

In der frühen Phase der Aggregation, wenn die amöboiden, voneinander unabhängigen Einzelzellen beginnen, sich zu einem multizellulären Verband zu organisieren (1,2), vermittelt ein komplexes Signalsystem die Zellkommunikation (3,4,9,10). Teil dieses Signalsystems ist die Ausschüttung diffundierender Transmitter ins Medium, die die Zellaktivitäten synchronisieren (13,66). Bei Dictyostelium discoideum wird Aufgabe des Kopplungsfaktors von cAMP übernommen (13).

Solche synchronen, periodischen Aktivitäten können mit Hilfe von Lichtstreuungsänderungen mit Zellsuspensionen von Dictyostelium registriert werden (18). In der Interphase zwischen vegetativem und voll-aggregationskompetentem Stadium ($t_{4.5}$ - t_6) beginnen die Zellen, bei $E_{405\ nm}$ messbare, spontane Spikes auszubilden (18). Diese sich in Perioden von 6 - 9 min wiederholenden Lichtstreuungsantworten werden von intra- und extrazellulären cAMP-Oscillationen begleitet (52).

Zeitlich mit dem optischen Peak zusammenfallend, steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel innerhalb von 1 - 2.5 min auf das 6 - 11-fache der Backgroundkonzentration an. Die Signalbreite im Halbmaximum beträgt durchschnittlich 1.25 min (siehe: Fig. 4 und 5 , linke Ordinate o—o / •—•) (66,67): Eine merkliche Ausschüttung des cAMP ins extrazelluläre Medium erfolgt erst, nachdem die intrazelluläre cAMP-Synthese schon begonnen, aber noch nicht ihr Maximum erreicht hat. Dies weist auf eine Phase hoher Synthese wie auch Transportaktivität der Zellen hin. Bis auf das 25-fache kann die extrazelluläre cAMP-Konzentration sich erhöhen, wobei das Signal durchschnittlich 100 sec breit ist. Das extrazelluläre cAMP erreicht

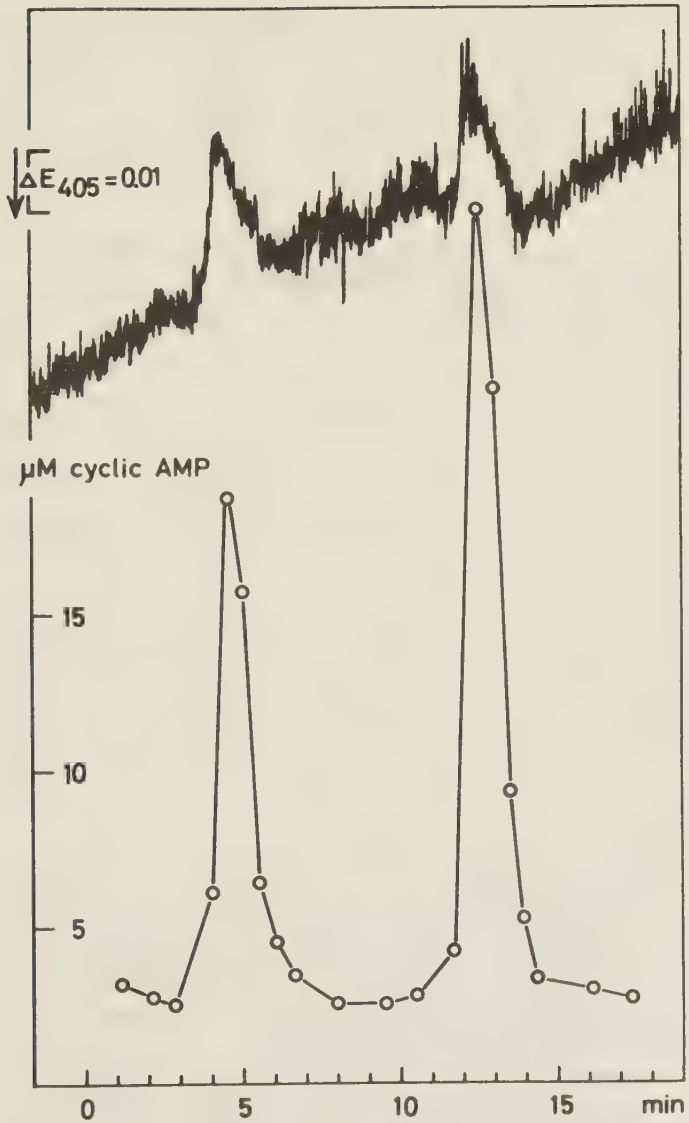

Fig. 4: Spontane periodische Lichtstreuungsänderungen (oben) in einer Zellsuspension und Oscillationen des intrazellulären cAMP-Spiegels (unten).
Ax-2 Zellen wurden getestet 6 Stunden nach Entfernung des Nährmediums.

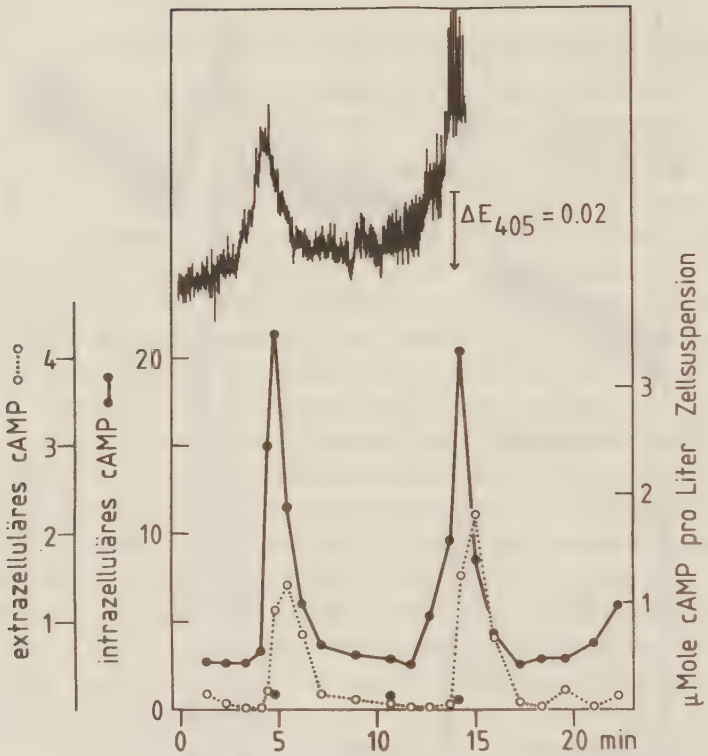

Fig. 5: Periodische Lichtstreuungsänderungen (oben) und cAMP-Oscillationen (unten) in einer Zellsuspension.
Linke Ordinate: intra- und extrazelluläre Oscillationen.
Rechte Ordinate: cAMP-Messungen im internen oder externen Kompartiment. Der Unterschied zwischen der linken und rechten Ordinate ist auf den unterschiedlichen Volumenanteil von Zellmasse und extrazellulärem Medium bezogen auf die Gesamtzellsuspension zurückzuführen. Die gefüllten nicht miteinander verbundenen Kreise entsprechen dem intrazellulären cAMP nach Inkubation der Extrakte mit Phosphodiesterase. Die ständige Probenentnahme reduziert das Küvettenvolumen, so dass gegen Ende des Versuchs die Lichtstreuungsänderung durch starkes Rauschen begleitet wird.

seinen Peak 30 - 45 sec später als das intrazelluläre; d.h. die Ausschüttung des cAMP ins Medium dauert noch an, wenn die intrazelluläre cAMP-Konzentration schon wieder abnimmt. Somit setzt sich die Dauer der Signalphase aus der für die Synthese des cAMP und seinen transmembranen Transport benötigten Zeit zusammen (siehe: Fig. 5) (52, 66, 35).

Aus dem Anstieg des intrazellulären cAMP während der höchsten Adenylcyclaseaktivität kann eine Synthese von 230 x 10^{-12} Molen cAMP/ min für 1 x 10^{7} Zellen errechnet werden, dagegen aus dem Anstieg im extrazellulären cAMP eine Ausschüttung von ca. 80 x 10^{-12} Molen cAMP/min für 1 x 10^{7} Zellen. Dies ist ein Nettoanstieg, der sich aus der Ausschüttungsrate und der Hydrolyserate ergibt.

Die Hydrolyse des cAMP ist vor allem auf die membrangebundene Phosphodiesterase zurückzuführen (20, 52, 66).

Vergleicht man die µMole cAMP/pro Liter Zellsuspension des intrazellulären cAMP vor dem Spike mit denen im extrazellulären Peak (siehe: Fig. 5, rechte Ordinate), so findet man im letzteren eine 2- bis 3-fache höhere Menge. Das bedeutet, - selbst ohne Berücksichtigung der PDE-Hydrolyseaktivität -, dass der grösste Teil des ins Medium ausgeschütteten cAMP neu synthetisiert wurde. Damit scheint eine Langzeitspeicherung für cAMP im internen Signalsystem keine wesentliche Rolle zu spielen (52).

In der Phase zwischen den spontanen Spikes liegt die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei ca. 3 µM, die extrazelluläre bei 0.15 µM. In der vegetativen Phase (t_1 - t_2), wenn die Zellen keine spontanen periodischen Aktivitäten zeigen, liegt die intrazelluläre cAMP-Konzentration zwischen 1.5 - 2 µM, die extrazelluläre bei ca. 0.1 - 0.15 µM. Somit unterscheiden sich die cAMP-Basislinien zwischen signalisierenden und nicht signalisierenden Zellen im intrazellulären Raum maximal um den Faktor 2, im extrazellulären Raum sind sie fast identisch (vgl.:

Fig. 7 mit Fig. 4 und 5).

3.1.2. Fehlende Signalkopplung bei Sinusschwingungen

In der späten Aggregationsphase (ca. t_{7-10}) bilden die Zellen in der "geschüttelten Suspension" über mehrere Stunden hinweg optisch registrierbare Sinusschwingungen mit einer Periode von ca. 7 - 10 min aus (18, 13). Diese periodisch wiederkehrenden Signale benötigen zu ihrer Synchronisation einen extrazellulären Kopplungsfaktor (13). Da das cAMP während der spontanen Spikes als Transmitter wirkt, war die Frage, ob es auch hier die Aufgabe eines Kopplungsgliedes übernimmt.

Von den insgesamt vier durchgeführten Versuchen zeigt sich bei zwei Messungen keine Aenderung im intra- (durchschnittlich 7 x 10^{-7}M cAMP) und extrazellulären (durchschnittlich 1 x 10^{-8}M cAMP) cAMP-Verlauf während der Sinusschwingung. Bei den anderen Versuchen erhöht sich im "Tal" der Sinusschwingung oder unmittelbar danach der intrazelluläre cAMP-Spiegel um das 2 - 3-fache und fällt nach ca. 2 min wieder auf die Backgroundkonzentration (durchschnittlich 2, bzw. 3 x 10^{-6}M) ab, lange bevor das Sinusmaximum erreicht ist. Extrazellulär verharrt der cAMP-Verlauf auf einer Grundlinie von durchschnittlich 2.5, bzw. 7.5 x 10^{-8}M.

Bei dem abgebildeten Versuch (Fig. 6) an Ax-2-17 Zellen ($t_{6.5}$) steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration auf das 3.68-fache im ersten und nur um das 2-fache im zweiten Peak an. Die Messung der Lichtstreuung wird hier schon gleich zu Anfang der Probenentnahme gestört; dadurch kann der cAMP-Verlauf nicht direkt mit der optischen Registrierung korreliert werden, sondern muss mit der Lichtstreuung vor der Probenentnahme verglichen werden.

Daraus ergibt sich, dass bei den Sinusschwingungen die Adenylcyclase wenn überhaupt dann in viel geringerem Masse zur cAMP-Synthese angeregt wird als bei den spontanen Spikes (35). Es scheint auch kein messbarer Transport des synthetisierten cAMP ins Medium stattzufinden.

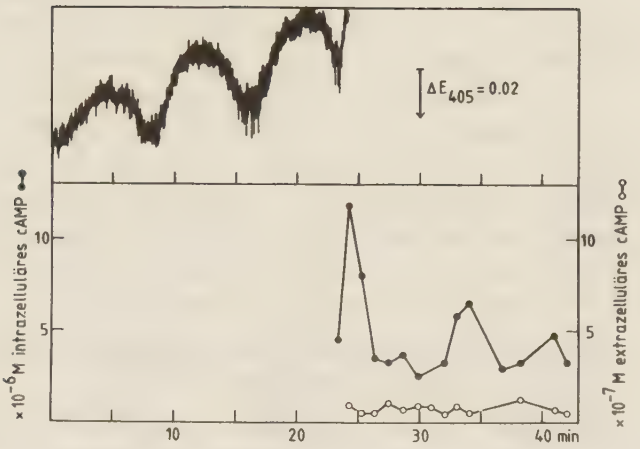

Fig. 6: Intra- und extrazellulärer cAMP-Spiegel (unten) bei sinusförmigen optischen Oscillationen. Messung an Ax-2-17 Zellen 6.5 Stunden nach Entfernung des Nährmediums.

Damit kann cAMP hier nicht als Transmitter wirken, sondern nur eine andere, bisher noch unbekannte Substanz.

3.2. Verlauf des cAMP-Spiegels bei induzierten Lichtstreuungsänderungen

3.2.1. Fehlende cAMP-Antworten bei vegetativen Zellen

Bringt man eine Suspension vegetativer Zellen (ca. t_1 - t_2) in eine mit Sauerstoff belüftete Küvette und registriert den Extinktionsverlauf bei 405 nm, so findet man keine spontanen Spikes (vgl.: 2.2.; 2.3.; 3.1.1.). Sie sprechen jedoch schon auf chemotaktische Stimuli an (18). Mikroskopisch erkennt man abgerundete, amöboid bewegliche Einzelzellen; die typische langgestreckte Zellform oder Strangbildung der aggregierenden Zellen fehlen (vgl.: 2.2.).

In dieser frühen Phase unterscheidet sich auch die optische Antwort im Vergleich zu aggregationsreifen Zel-

len. Anstelle eines zweigipfligen optischen Signals erscheint nur eines, zeitlich identisch mit der ersten "schnellen" Antwort von aggregierenden Zellen (18).

Die Frage war nun, ob diese optische Antwort von einem cAMP-Signal begleitet wird. Auf einen externen cAMP-Puls (5×10^{-8}M) reagieren die Zellen nicht mit einer Aenderung im cAMP-Spiegel. Die cAMP-Konzentration bleibt während den ganzen Messungen unverändert zwischen ca. 1.5 - 2 uM für intrazelluläres und ca. zwischen 1 - 1.5 x 10^{-7}M für extrazelluläres cAMP (siehe: Fig. 7.)

3.2.2. cAMP- und cGMP-Verlauf bei präaggregationsreifen Zellen nach einem cAMP-Puls

Zellen im präaggregationsreifen Entwicklungsstadium (ca. $t_{2.5}$ - t_4) zeigen wie vegetative noch keine spontanen Lichtstreuungsänderungen. Auch die optische Antwort auf einen cAMP-Puls besteht nur aus einem Signal (18). Betrachtet man einen Zellausstrich mikroskopisch, so findet man keinen Unterschied zu den vegetativen Zellen (vgl.: 2.2.). Anders als bei vegetativen Zellen jedoch bewirkt ein externer cAMP-Puls bei präaggregationsreifen Zellen eine verstärkte cAMP-Synthese sowie den Release des synthetisierten cAMP ins Medium.

Bei einem Versuch an $t_{2.5}$ alten Zellen (siehe: Fig. 8) wurden sowohl der cAMP als auch der cGMP-Verlauf nach einem cAMP-Puls (5×10^{-8}M) gleichzeitig gemessen (nach: 2.6.). Hierbei erhöht sich die intrazelluläre cAMP-Konzentration um das 13-fache (2.1×10^{-7}M vor und 2.7×10^{-6}M cAMP nach dem Puls); die intrazelluläre cGMP-Konzentration dagegen nur um das 4.1-fache (3.2×10^{-7}M vor und 1.3×10^{-6} M cGMP nach dem Puls). Extrazellulär steigt der cAMP-Spiegel auf das 27-fache (8.7×10^{-10}M vor und 2.3×10^{-8}M cAMP nach dem Puls), der cGMP-Spiegel auf das 18-fache an (3×10^{-9}M vor und 5.4×10^{-8}M cGMP nach dem Puls).

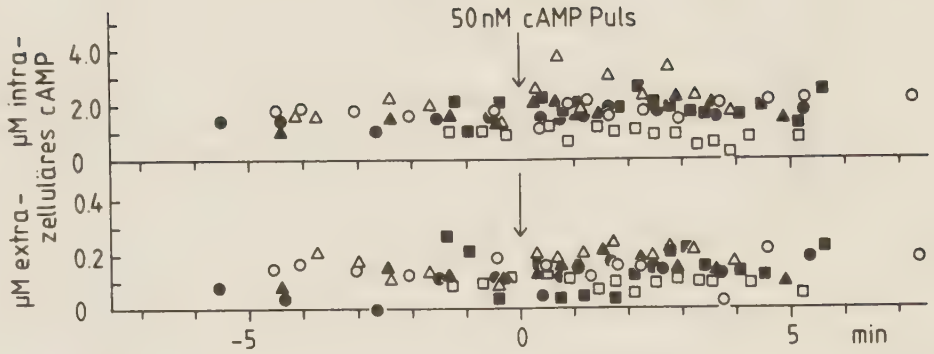

Fig. 7: Die Wirkung von cAMP-Pulsen auf den intra- (oben) und extrazellulären (unten) cAMP-Spiegel bei vegetativen Zellen.

Insgesamt 6 Messungen an Ax-2 Zellen wurden durchgeführt innerhalb 1 - 2 Stunden nach Entfernung des Nährmediums. Die Zeit des cAMP-Stimulus wurde 0 gesetzt, die Messwerte links davon beziehen sich auf den cAMP-Spiegel vor dem Puls, rechts davon auf diejenigen nach dem Puls. Die cAMP-Pulse hatten eine Grösse von 5×10^{-8}M.

Die Halbwertsbreiten für die Signalantworten sind: 112 sec für intrazelluläres, 96 sec für extrazelluläres cAMP; 78 sec für intrazelluläres und 48 sec für extrazelluläres cGMP. Eine Besonderheit tritt im zeitlichen Verlauf der cAMP-Antwort auf. Schon vor dem intrazellulären cAMP-Gipfel erreicht der extrazelluläre cAMP-Spiegel sein Maximum. Bei spontanen Oscillationen tritt der Release des cAMP ins Medium sonst erst nach, seltener auch synchron mit der internen cAMP-Synthese auf. Hier dagegen ist der extrazelluläre cAMP-Peak dem intrazellulären vorgelagert. Zeitlich zusammen erscheinen somit extrazelluläres cAMP und intrazelluläres cGMP-Maximum zum einen und extrazelluläres cGMP und intrazelluläres cAMP zum anderen. Die optische Antwort ist hier sehr schwach ausgeprägt. Um zu prüfen, ob die rasch aufeinanderfolgende Probenentnahme die Lichtstreuungsmessung beeinflusst habe, wurde ein zweiter cAMP-Puls (5×10^{-8}M, 10.7 min nach dem ersten) appliziert (ohne cAMP- und cGMP-Bestimmung), der jedoch ebenfalls keine signifikante optische Antwort ergab. Die Zellsuspension verblieb während der weiteren Registrierung des Extinktionsverlaufs bis $t_{4.5}$ ohne spontane Aktivitäten, entsprach im "mikroskopischen Kontrolltest" (siehe 2.2.) jedoch den Erwartungen.

Eine an t_4 alten Zellen durchgeführte Messung (siehe Fig. 9) ergibt einen 24-fachen Konzentrationsanstieg (6.1×10^{-8}M cAMP vor dem Puls zu 14.7×10^{-7}M im Peak) für intrazelluläres und einen 135-fachen im ersten, einen 92 fachen im zweiten Peak für extrazelluläres cAMP (5×10^{-10}M cAMP vor dem Puls zu 6.8, bzw. 4.6×10^{-8}M cAMP im Peak). Der intrazelluläre cGMP-Spiegel steigt um das 2.7-fache an (4.1×10^{-7}M vor dem Puls zu 11×10^{-7}M im Peak); der extrazelluläre cGMP-Spiegel erhöht sich um das 11.5-fache im ersten, um das 8.7-fache im zweiten Peak (7.6×10^{-9}M vor dem Puls zu 8.7, bzw. 6.6×10^{-8}M im Peak). Die Halbwertsbreite der Signalantworten liegt bei 84 sec für intrazelluläres und bei 114 sec für extrazel-

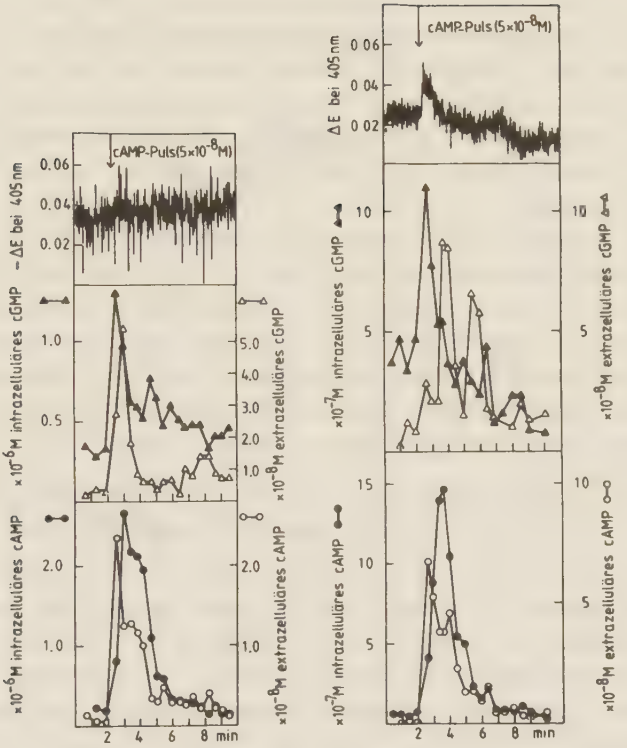

Fig. 8 und 9: Intra- und extrazellulärer cAMP-Spiegel (unten) sowie intra- und extrazellulärer cGMP-Spiegel (Mitte) im Verlauf einer durch cAMP-Puls induzierten optischen Antwort (oben) bei präaggregationsreifen Zellen.

Fig.8: Messung an $t_{2.5}$ alten Ax-2 Zellen.

Fig.9: Messung an t_4 alten Ax-2 Zellen.

luläres cAMP, für intrazelluläres cGMP bei 75 sec, bei 58 sec für extrazelluläres cGMP.

Die Ausschüttung des cAMP erfolgt schon mit Beginn der cAMP-Neusynthese, bevor das intrazelluläre Maximum erreicht ist. Während der extrazelluläre cAMP und der intrazelluläre cGMP-Peak mit der optischen Antwort zusammenfallen, erscheint der intrazelluläre cAMP-Peak zusammen mit dem extrazellulären cGMP erst 85 sec nach der externen cAMP-Zugabe.

Die optische Antwort ist hier deutlich. 8.1 min vor dem gemessenen cAMP-Puls war die "optische Antwortfähigkeit" der Zellsuspension durch einen Testpuls (5 x 10^{-8}M cAMP) geprüft worden. Auch hier zeigten sich bei der weiteren optischen Registrierung bis $t_{5.5}$ - bei normalem Ablauf des "Differenzierungsprogramms" (mikroskopisch (siehe: 2.2.)) - keine spontanen Aktivitäten.

3.2.3. Verschiedene Muster im cAMP-Verlauf nach Stimulierung durch cAMP bei aggregationsreifen Zellen

Die früher (13, 20) stets auftretende, typische Doppelantwort im extrazellulären cAMP-Verlauf als Antwort auf einen extern gegebenen cAMP-Puls (5 x 10^{-8}M) wird bei aggregationsreifen Zellen nicht mehr ausschliesslich gefunden. Das mag zum einen an dem heterogenen Zustand der früheren Ax-Kulturen liegen, die nicht nur von einem Klon stammten, sondern eine Mischung darstellten. Dadurch könnte nur ein Teil der Zellen befähigt sein, mit einer ersten schnellen Antwort zu reagieren, während die anderen Zellen - getriggert durch diese erste Reaktion - mit der internen cAMP-Synthese und der anschliessenden cAMP-Ausschüttung ins Medium folgen (18, 13). Zum anderen mag das Auftreten verschiedener Signalmuster auch am Aggregationszustand der Zellkultur liegen.

Bei Ax-2-110 Zellen zur Zeit t_{10}, die unmittelbar vor dem Experiment keine spontanen, optischen Spikes zeigten und die auch keinen cAMP-Test-Puls erhalten hatten wurde ein extra- und dazu ein intrazellulärer cAMP-Doppel-

peak gemessen (siehe Fig. 10). Mit der ersten optischen

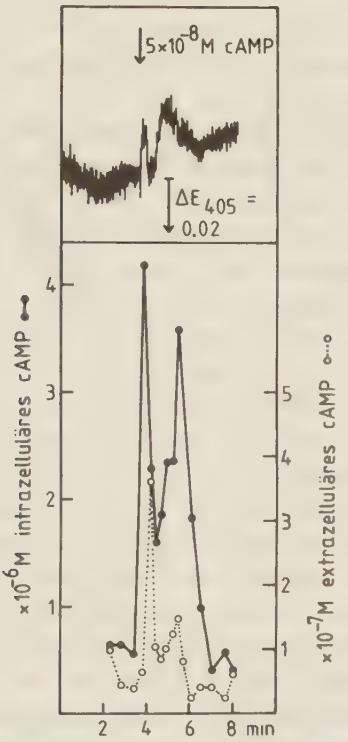

Fig. 10: Durch cAMP-Puls induzierte Lichtstreuungsänderung (oben) und Aenderungen im intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel (unten).

Messung an Ax-2-110 Zellen 10 Stunden nach Entfernung des Nährmediums bei einer Zelldichte von 2 x 10^8/ml.

Antwort zeitlich zusammenfallend erscheint 13 sec nach dem cAMP-Puls das erste interne cAMP-Maximum, 20 sec später wird das extrazelluläre cAMP-Maximum erreicht. Einem intrazellulären Minimum nach 45 sec - extrazellulär um 15 sec verzögert - folgt ein zweiter extra- und intrazellulärer cAMP-Peak ca. 2 min nach dem Puls. In den intra-

zellulären Peaks steigt die cAMP-Konzentration auf das 8-fache, bzw. 7-fache (von durchschnittlich 5 x 10^{-7}M in der Basislinie auf 4.2 x 10^{-6}M, bzw. 3.6 x 10^{-6}M im Maximum); im Extrazellulären dagegen auf das 7-, bzw. 3-fache der Backgroundkonzentration an. (Von durchschnittlich 5 x 10^{-8}M in der Basislinie zu 3.6, bzw. 1.5 x 10^{-7}M im Peak).

Bei Zellen eines früheren Aggregationsstadiums (t_6 - t_7) erscheint im wesentlichen ein ausgeprägtes Einzelsignal, das entweder mit dem ersten oder mit dem zweiten optischen Peak nach einem cAMP-Puls zeitlich zusammenfällt. Als Erklärungsmöglichkeit für dieses unterschiedliche Verhalten kommt in Betracht, dass sich Zellen durch spontane Oscillationen so synchronisieren, dass sie gleichzeitig mit einer schnellen Antwort auf ein externes Signal antworten können. Bei Zellen dagegen, die noch nicht spontan oscilliert hatten, würde nur ein Teil unmittelbar auf das externe Signal reagieren, die Mehrzahl jedoch auf die Signale der sofort reagierenden Zellen. Dadurch würde der Haupt-Peak des cAMP verzögert erscheinen. Wie die folgenden Versuch zeigen, treten beide Signalmuster bei oscillierenden wie auch nicht oscillierenden Zellen auf. Wahrscheinlich liegen der Uebersetzung eines externen Signals in ein autonomes cAMP-Signal mehrere Schritte eines komplexen bisher unbekannten Mechanismus zugrunde, der nicht durch diese einfache Annahme erklärt werden kann.

Das in der Abbildung (Fig. 11) gezeigte Signalmuster wurde an t_7 alten Ax-2-110 Zellen gemessen, die vorher spontan oscilliert hatten. Die mit dem ersten optischen Peak zusammenfallende intrazelluläre cAMP-Antwort 16 sec nach dem Puls erreicht eine 3-fache Konzentrationserhöhung (0.83 zu 2.6 x 10^{-6}M cAMP). Der extrazelluläre cAMP-Spiegel - zeitlich um 30 sec zum intrazellulären verschoben - steigt auf das 6-fache der Backgroundkonzentration an (1.1 x 10^{-7}M zu 6.8 x 10^{-7}M cAMP).

In einem anderen Versuch ($t_{6.5}$, Ax-2-10 Zellen), bei dem die Zellen ebenfalls oscilliert hatten, wird erst

synchron zum zweiten optischen Peak ein deutliches intra- und extrazelluläres cAMP-Signal ausgeprägt (Fig. 12).

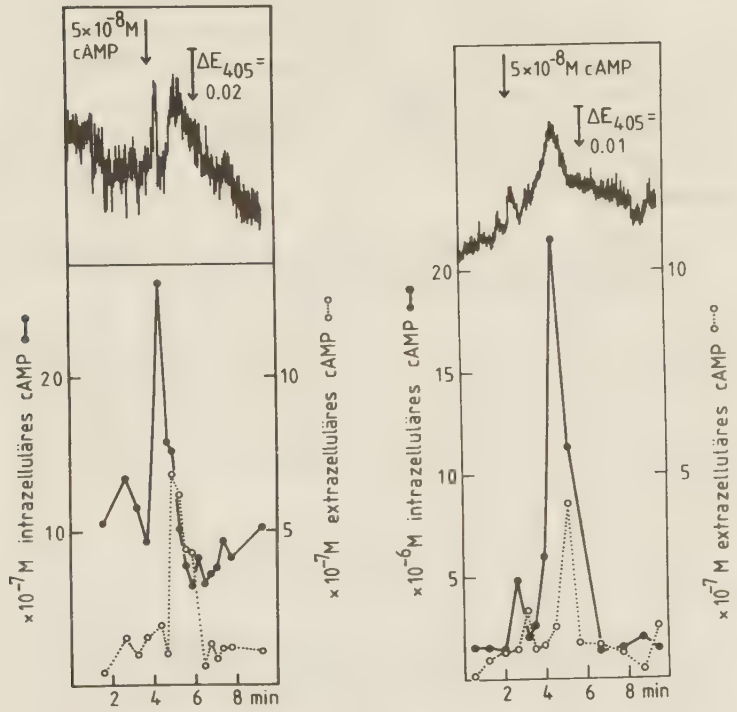

Fig. 11 und 12: Intra- und extrazellulärer cAMP-Spiegel (unten) im Verlauf einer durch cAMP-Puls induzierten optischen Antwort (oben).

Fig. 11: Messung an t_7 alten Ax-2-110 Zellen und

Fig. 12: an $t_{6,5}$ alten Ax-2-10 Zellen bei einer Zelldichte von 2 x 10^8/ml.

125 sec nach dem cAMP-Puls erreicht das intrazelluläre cAMP mit einem 14-fachen Konzentrationsanstieg sein Maxi-

mum, (von durchschnittlich 1.5 x 10^{-6}M in der Basislinie auf 21.5 x 10^{-6}M im Peak), das extrazelluläre cAMP - 40 sec später - erhöht sich auf das 6-fache im Peak (0.73 x 10^{-7}M zu 4.29 x 10^{-7}M).

Bei diesem Experiment (Fig. 12) ist zwar noch ein erstes cAMP-Signal - 15 sec nach dem Puls - mit einem 3-fachen intrazellulären Konzentrationsanstieg und 45 sec nach dem cAMP-Stimulus mit einer 2-fachen extrazellulären Konzentrationserhöhung messbar, das jedoch im Vergleich zur gesamten cAMP-Antwort dieses Versuches nur schwach ausgeprägt ist.

3.3. Refraktärität der Zellen in bezug auf induzierte Signale während spontaner Oscillationen

Es sollte untersucht werden, ob optisch schwingende Zellen, die in einem oder kurz vor einem erwarteten spontanen Spike einen externen cAMP-Puls erhalten, zusätzlich zu dem bei spontanen Spikes auftretenden intra- und extrazellulären cAMP-Peak noch ein zweites Signal ausbilden oder ob sie refraktär sind.

Bei dem in Fig. 13 abgebildeten Versuch an einer $t_{6.5}$ alten Ax-2-110 Kultur oscillierten die Zellen mit einer Periode von 7.5 min. Genau mit 7.5 min Abstand zur vorherigen spontanen optischen Antwort wurde in die Zellsuspension, die gerade wiederum ihren Lichtstreuungspeak erreicht hatte, ein externer cAMP-Puls (5 x 10^{-8}M) gegeben. Insgesamt erscheint nur ein cAMP-Signal, das seinem zeitlichen Verlauf nach als spontaner Puls gedeutet werden muss, da der intrazelluläre cAMP-Peak mit einem 12-fachen Konzentrationsanstieg (durchschnittlich 5.1 x 10^{-7}M in der Basislinie zu 6.12 x 10^{-6}M im Peak) schon erreicht ist, wenn der externe cAMP-Puls appliziert wird. Der extrazelluläre cAMP-Peak wird zwar gleichzeitig mit dem intrazellulären erreicht, jedoch beginnt der Transport des cAMP 75 sec später als die interne cAMP-Synthese. Dabei steigt das extrazelluläre cAMP auf das 20-fache (1.88 x 10^{-7}M)

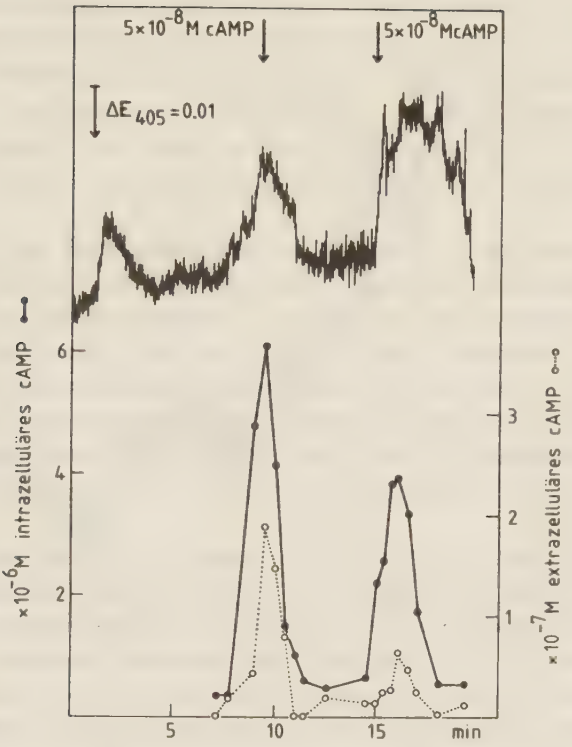

Fig. 13: Intra- und extrazellulärer cAMP-Spiegel (unten) bei spontanen optischen Oscillationen, kombiniert mit durch cAMP-Pulse induzierten optischen Antworten (oben).

Messung an Ax-2-110 Zellen 6.5 Stunden nach Entfernung des Mediums bei einer Zelldichte von 2 x 10^8/ml.

der Backgroundkonzentration (durchschnittlich 9.4 x 10^{-9}M) an .

Ein zweiter cAMP-Puls (5 x 10^{-8}M) wurde 5.5 min später, also 2 min vor dem erwarteten nächsten spontanen optischen Spike, gegeben. Schon 10 sec nach dem Puls steigt das intrazelluläre cAMP signifikant an und erreicht nach 70 sec seinen Maximalwert, der ca. 8-mal über der Basislinie liegt (0.51 zu 3.96 x 10^{-6}M). Zum Zeitpunkt der erwarteten spontanen optischen Antwort nimmt die in-

terne cAMP-Synthese schon wieder ab. Der extrazelluläre cAMP-Peak fällt auch hier mit dem internen zusammen, wobei der Transport des cAMP 75 sec verzögert zur intrazellulären Synthese beginnt. Die Konzentrationsänderung (9.4×10^{-9}M zu 6.9×10^{-8}M) ist mit einem ca. 7-fachen Anstieg geringer als bei der ersten gemessenen cAMP-Antwort.

Hier ist es schwieriger, das cAMP-Signal der Lichtstreuungsantwort zuzuordnen. Zeitlich fällt der intrazelluläre cAMP-Peak mit der zweiten optischen Antwort auf den cAMP-Puls zusammen. Ob sich jedoch an den 2. optischen Peak unmittelbar ein spontaner Spike anschliesst oder ob der gegebene cAMP-Puls Phaseshift auslöst kann wegen des starken Rauschens in der Lichtstreuung - verursacht durch häufige Probenentnahme aus der Küvette - nicht genau gesagt werden.

Auffallend bei diesen Messungen ist jedoch die Dauer des Signals. Während der intrazelluläre cAMP-Peak bei induzierten Antworten im Durchschnitt eine Halbwertsbreite von ca. 1 min aufweist, bei spontanen optischen Spikes ca. 1.25 min, ist sie hier bis auf 1.75 - 2 min ausgedehnt. Es könnte sein, dass durch den externen cAMP-Puls die Stimulierung der Adenylcyclase zwar länger andauert aber nicht in der Form, dass ein weiteres cAMP-Signal ausgeprägt werden kann.

Bei einem weiteren Versuch (Ax-2-10, t_9) wurde ein cAMP-Puls in spontan sinusoidal, mit einer Frequenz von 9 min schwingende Zellen gegeben, - und zwar ins Maximum der Sinusschwingung - ; dabei bildet sich eine optische Doppelantwort aus (Fig. 14). Die cAMP-Konzentration im intrazellulären Peak, - ca. 100 sec nach dem cAMP-Puls-, der gleichzeitig mit dem zweiten optischen Peak auftritt, steigt auf das 23-fache der Backgroundkonzentration an. (5.5×10^{-7}M zu 12.5×10^{-6}M). Das extrazelluläre cAMP wird erst ausgeschüttet, wenn die interne cAMP-Synthese schon begonnen hat, erreicht aber gleichzeitig mit dem

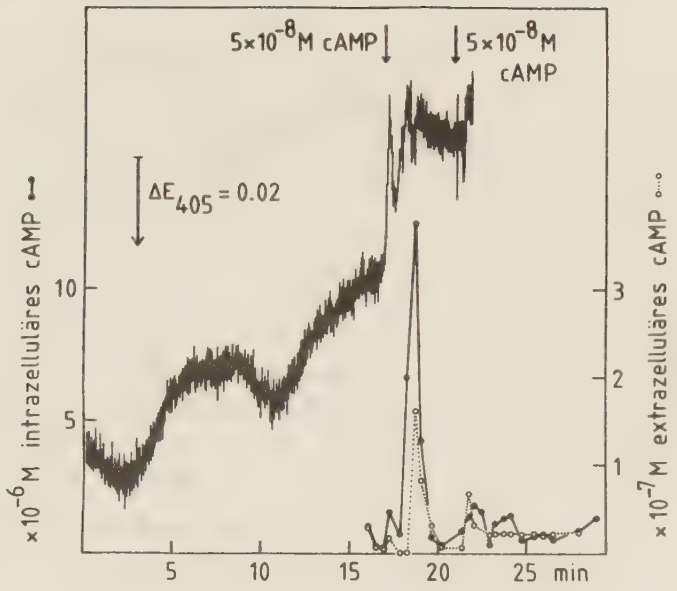

Fig. 14: cAMP-Pulse bei spontanen sinusförmigen Lichtstreuungsänderungen (oben) und Aenderungen im intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel (unten).

Messung an Ax-2-10 Zellen 9 Stunden nach Entfernung des Mediums bei einer Zelldichte von 2 x 10^8/ml.

intrazellulären Peak seinen Maximalwert, der 12 mal über der extrazellulären Backgroundkonzentration liegt (1.3 x 10^{-8}M zu 1.62 x 10^{-7}M). Ein zweiter cAMP-Puls, 4.5 min nach dem ersten zu der Zellsuspension gegeben, löst keine signifikante Antwort aus - weder optisch noch in cAMP-Spiegel -. Das bedeutet, die Zellen sind noch refraktär oder geben im oder kurz nach dem "Tal der Sinusschwingung" - mit dem dieser zweite cAMP-Puls zeitlich zusammenfällt - kein Signal auf cAMP.

3.3.1. Refraktaerität der Zellen bei Mehrfachstimulierung durch cAMP

Bei dem im Kapitel 3.4.1. beschriebenen Experiment (siehe Fig. 15) bei 13°C wurde versucht, die Zellen ein zweites Mal, 5.75 min nach der ersten cAMP-Zugabe, mit 5×10^{-8}m cAMP zu stimulieren. Sie reagierten bei 13°C weder optisch noch mit Aenderungen im cAMP-Spiegel, während bei 22°C ein zu diesem Zeitpunkt gegebener zweiter cAMP-Puls eine positive Antwort hervorruft. Das heisst, die Zellen sind hier noch refraktär, obwohl der interne cAMP-Spiegel schon fast wieder auf seine Basislinie (zum Zeitpunkt des Pulses liegt die interne cAMP-Konzentration nur ca. 2.5- fach über der Basislinie) abgesunken und der cAMP-Transport ins Medium abgeschlossen ist, da der extrazelluläre cAMP-Spiegel wieder auf seiner Grundlinie liegt.

3.4. Niedrige Temperaturen und ihre Auswirkungen auf die Signalform bei induzierten Antworten

3.4.1. cAMP-Verlauf nach cAMP-Pulsen bei 13°C

Wird die O_2 belüftete Zellsuspension in der Küvette von 22°C auf 13°C, bzw. auf 3°C heruntergekühlt,so verändert sich die optische Antwort auf cAMP-Pulse. Erscheint bei "Normaltemperatur", entspricht 22°C, der schnelle optische Peak nach ca. 15 sec, gefolgt vom zweiten Peak ca. 90 sec nach dem Puls, so wird bei 13°C die erste optische Antwort erst nach ca. 30 sec ausgebildet, der zweite Peak dann erst ca. 3.25 min nach dem Puls. Bei 3°C schliesslich reagieren die Zellen nur noch mit einer optischen Antwort ca. 45 sec nach der externen cAMP-Zugabe (68).

Nimmt man an, dass neben der optischen Reaktion auch die Aktivierung der Adenylcyclase zur cAMP-Synthese wie auch die Hydrolyse des cAMP durch die Phosphodiesterasen bei niedereren Temperaturen verlangsamt wird, so sollte eine bessere Zeitauflösung der Signale erreicht werden. Treten z.B. nach einem cAMP-Puls bei 22°C zwei eng aufein-

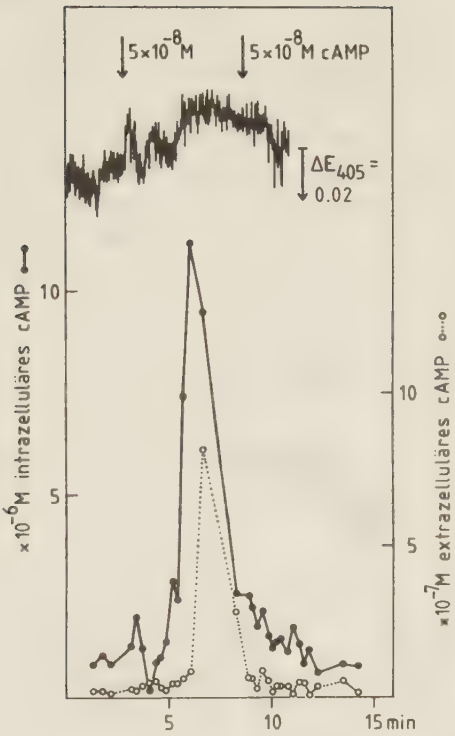

Fig. 15: Mehrfachstimulierung durch cAMP-Pulse bei 13°C. Ihre Auswirkung auf die Lichtstreuung (oben) wie auf den intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel (unten).

Messung an Ax-206 Zellen 7.5 Stunden nach Entfernung des Mediums bei einer Zelldichte von 2 x 10^8/ml.

aufeinanderfolgende, - messbar zu einem einzigen verschmolzen -, cAMP-Signale auf, so sollten bei 13°C, bzw. bei 3°C beide Signale getrennt erfasst werden können.

Beim in Fig. 15 abgebildeten Versuch bei 13°C antworteten die Zellen (Ax-206, $t_{7.5}$) mit einem breiten intrazellulären cAMP-Peak 3 min nach dem cAMP-Puls (5 x 10^{-8}M),

gefolgt vom extrazellulären Maximum 30 sec später. Die Halbwertsbreite beträgt 2 min für den intrazellulären und 1.5 min für extrazellulären cAMP-Peak. Daneben tritt ein sehr schwacher intrazellulärer Peak 30 sec nach dem Puls auf. Intrazellulär steigt die cAMP-Konzentration im Peak auf das 10-fache, extrazellulär sogar auf das 20-fache an.

Die Signalform variiert bei den 13°C-Messungen. Die intrazelluläre cAMP-Antwort kann wie in Fig. 16, -

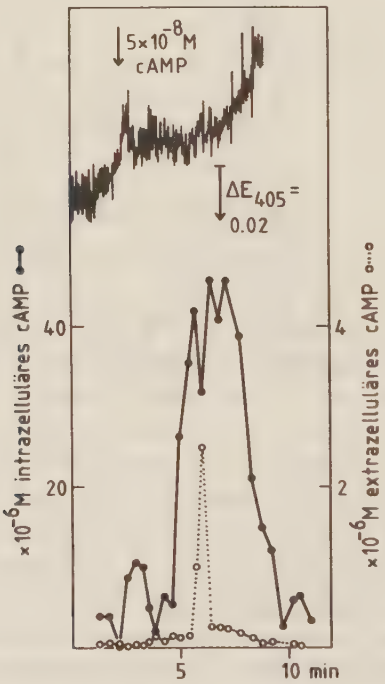

Fig. 16: Intra- und extrazellulärer cAMP-Verlauf (unten) nach einer durch cAMP-Puls induzierten optischen Antwort (oben) bei 13°C.

Messung an t_8 alten Ax-2O6 Zellen bei einer Zelldichte von 2 x 10^8/ml.

bei Ax-206, t_8 Zellen gemessen -, bis auf eine Halbwertsbreite von über 3 min ausgedehnt sein. Der erste interne cAMP-Peak, schon 15 sec nach dem Puls hier ausgeprägt, ist mit einer 2.5-fachen Konzentrationsänderung wiederum sehr klein gegenüber dem zweiten Signal mit einem 11-fachen Konzentrationsanstieg. Extrazellulär steigt das cAMP sogar auf das 60-fache an, jedoch ist das Signal mit 27 sec im Halbmaximum sehr schmal.

Interessant ist hierbei, dass im extrazellulären Raum das cAMP schon wieder auf die Backgroundkonzentration herabgesunken ist, wenn es sich intrazellulär noch im Maximum befindet. Das würde bedenken, die Zellen schliessen die Membranporen und verhindern damit einen weiteren Transport des cAMP ins Medium.

3.4.2. cAMP-Verlauf nach cAMP-Pulsen bei $3^{o}C$

In drei von vier bei $3^{o}C$ durchgeführten Versuchen (bei t_7 - 7.5 Ax-2 Zellen) tritt nach dem cAMP-Puls ($5 \times 10^{-8}M$) keine signifikante Aenderung sowohl im intra- wie im extrazellulären cAMP-Verlauf auf.

Auffallend jedoch ist in zwei Versuchen der aussergewöhnlich hohe intrazelluläre cAMP-Spiegel von $2.4 \times 10^{-5}M$ (Fig. 17) im einen und ca. $1 \times 10^{-5}M$ im anderen Versuch. Im dritten Experiment liegt er - wie oft bei $22^{o}C$ gemessen - bei $1 \times 10^{-6}M$ (Fig. 18). Extrazellulär liegt die cAMP-Konzentration im wesentlichen zwischen $0.1 - 0.5 \times 10^{-7}M$.

Es ist möglich, dass während des Herunterkühlens der Zellsuspension in der Küvette von $22^{o}C$ auf $3^{o}C$ die cAMP-Synthese und die cAMP-Hydrolyse so beeinträchtigt werden, dass der cAMP-Spiegel in etwa erhalten bleibt, - sei er nun gerade hoch oder niedrig -, den die Zellen in noch "aktivem Zustand" gerade erreicht hatten.

Bei einem 4. Versuch an t_7 Zellen steigt nach dem cAMP-Puls ($5 \times 10^{-8}M$) die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach ca. 9 min auf 14 µM an, verglichen zu 2.5 µM vor dem Puls. Vor diesem Peak jedoch zeigt der cAMP-Verlauf

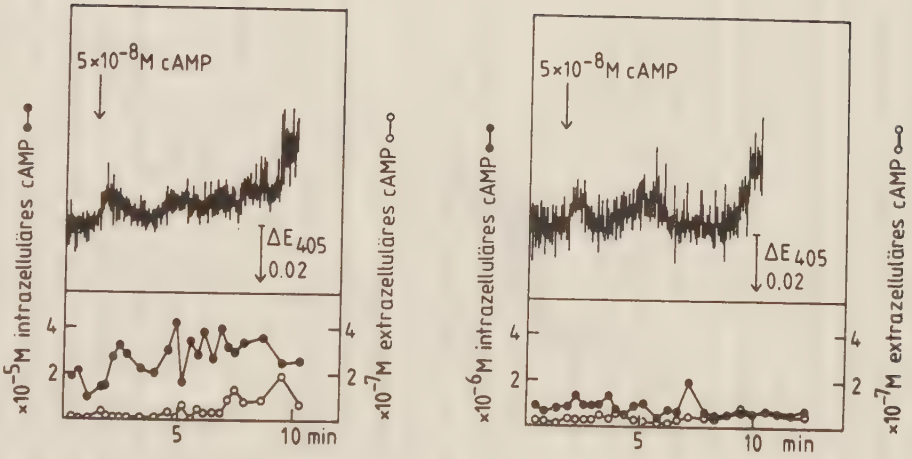

Fig. 17 und 18: cAMP-induzierte Lichtstreuungsänderung bei 3°C (oben) und intra- wie extrazellulärer cAMP-Spiegel (unten).

Messung für beide Versuche an $t_{7 - 7.5}$ alten Ax-2 Zellen bei 2 x 10^8 Zellen/ml.

intrazellulär sehr starke Schwankungen zwischen 2-9 /uM, so dass die cAMP-Antwort nur schwer als Reaktion auf den externen Stimulus gedeutet werden kann, zumal auch keinerlei zeitliche Zuordnung zum Lichtstreuungssignal möglich ist.

Auch extrazellulär tritt dieses starke Rauschen im cAMP-Spiegel auf; dennoch ist ein Peak mit 7.8 x 10^{-7}M 2 min nach dem intrazellulären Peak erkennbar. Bis zum Peak schwankt sie zwischen 0.5 - 4 x 10^{-7}M. Inwieweit man jedoch in diesem Versuch dem cAMP-Signal Signifikanz beimessen kann, ist bei dem starken irregulären Kurvenverlauf im cAMP-Spiegel fraglich.

3.5. Beziehung zwischen der zellulären cAMP-Konzentration und der Ausschüttungsrate

Ein Vergleich zwischen der Geschwindigkeit der cAMP-Ausschüttung und der intrazellulären cAMP-Konzentration (Fig. 19a) sollte die Frage beantworten, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Transport und Synthese besteht. Die Ausschüttungsrate wird ermittelt durch: die Summe aus der Konzentrationsdifferenz ($\Delta c_{1',2'...n'}$) zwischen jeweils zwei aufeinanderfolgenden experimentellen Messpunkten des extrazellulären cAMP-Spiegels normalisiert auf Δ t = 60 sec und der PDE-Hydrolyserate bei der mittleren extrazellulären cAMP-Konzentration zwischen denselben Messpunkten. Die Messung und Errechnung der PDE-Hydrolyse ist im Methodenteil (2.7.3.) erklärt.

Bei fünf voneinander unabhängigen Experimenten (Ax-2-Zellen, im Stadium zwischen t_4 und t_9, 22°C), in denen insgesamt 4 cAMP-Pulsversuche, 1 spontane Oscillation und 2 spontane Oscillationen kombiniert mit applizierten cAMP-Pulsen repräsentiert sind, wurde die PDE-Hydrolyse gemessen und die Ausschüttungsrate berechnet. Die V_{max}-Werte der PDE-Hydrolyserate liegen in diesen Experimenten bei: 3.08, 3.8, 4.34, 5.24 und 13.24 /uM x min^{-1}/2 x 10^{11} Zellen.

Trägt man von jeder Messung den zeitlichen Verlauf

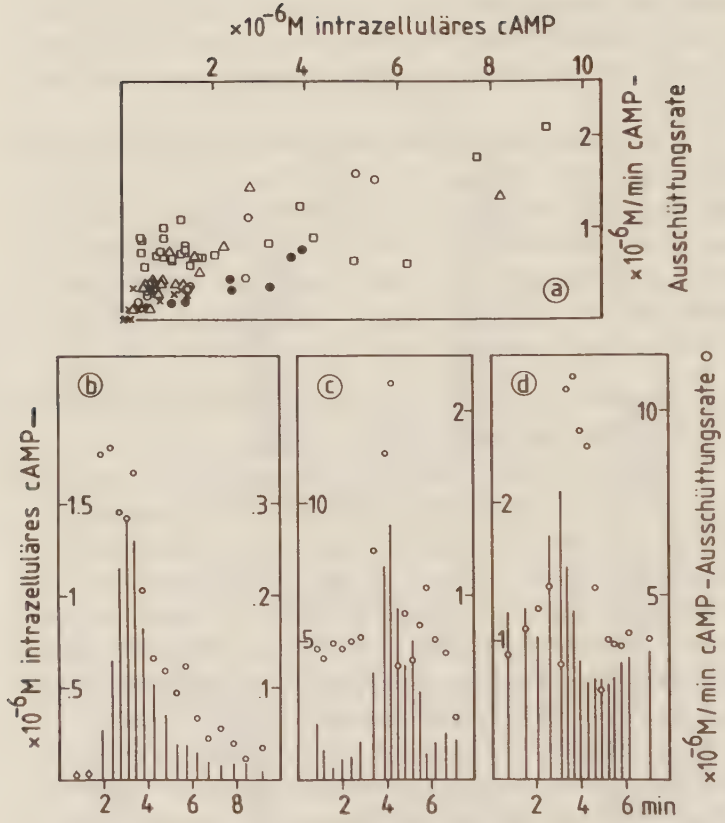

Fig. 19: a Korrelation zwischen dem intrazellulären cAMP-Spiegel und der cAMP-Ausschüttungsrate. Für fünf voneinander unabhängige Experimente (t_4 - t_9 alte Ax-2-Zellen, 22°C) wurde die Ausschüttungsrate (siehe ausführlich 3.5.) ermittelt und gegen die jeweils dazugehörige interne cAMP-Konzentration aufgetragen.

b - d Drei Beispiele für Unterschiede im zeitlichen Verlauf der internen cAMP-Konzentration zum zeitlichen Verlauf der cAMP-Ausschüttungsrate.

Die internen cAMP-Konzentrationen sind durch ausgezogene Linien (-) gekennzeichnet. Die Kreise (o) stellen die jeweils errechneten Werte für die Ausschüttungsrate dar, die zu den entsprechenden internen cAMP-Konzentrationen gehören.

der intrazellulären cAMP-Konzentration und den der Ausschüttungsrate übereinander auf (Bild 19 b - d), so zeigt sich bei zwei Messungen eine deutliche, bei zwei eine schwächere Parallelität zwischen der Synthese und dem Transport, d. h. die höchste Ausschüttungsrate wird im intrazellulären cAMP-Peak erreicht. Im intrazellulären cAMP-Minimum ist in diesen Experimenten auch die Ausschüttungsrate am niedrigsten (19 c). Bei zwei Messungen erreicht der Transport des cAMP ins Medium schon ein Maximum, bevor die intrazelluläre Konzentration ihr Maximum erreicht (19 b). Bei einer Messung erfolgt die cAMP-Ausschüttung erst nach dem intrazellulären cAMP-Peak. Die Ausschüttungsrate liegt noch bei hohen Werten, wenn die intrazelluläre cAMP-Konzentration schon wieder auf die Grundlinie abgefallen ist (19 d).

Eine Aussage darüber, wie streng die Transportrate von der intrazellulären Konzentration abhängig ist, kann die Errechnung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmasses für das Diagramm: intrazelluläre cAMP-Konzentration (x) gegen Ausschüttungsrate (y) geben (Bild 19 a). Von den obigen fünf Experimenten können dazu nur vier herangezogen werden, da in einem Experiment die intrazellulären cAMP-Werte (nur 2.6 und 3.1 /uM im Peak) sehr niedrig zu den relativ hohen extrazellulären cAMP-Werten (0.68 und 0.25 /uM im Peak) und der grössten gemessenen PDE-Hydrolyserate (13.24 /uM/min) liegen.

Für die restlichen vier Versuche lässt sich eine Regressionsgerade erstellen mit der Gleichung: $y = 0.2634 + 0.0974\,x$. Um die Genauigkeit dieser Regressionsgeraden zu ermitteln, wurde das Bestimmtheitsmass B_{yx} errechnet, das um so näher bei 1 liegen muss, je geringer die Abweichungen der einzelnen Messwerte von der errechneten Regressionsgeraden sind (69). Als Bestimmtheitsmass ergibt sich $B_{yx}=0.5669$. Das heisst, nur 57% der Gesamtvarianz lässt sich aus der Abhängigkeit der Ausschüttungsrate von der intrazellulären cAMP-Konzentration erklären, während 43% nicht daraus erklärt werden können.

Zusammengefasst bedeutet dies: zwichen dem Transport und der Synthese besteht keine enge Korrelation. Der Mecha-

nismus des cAMP-Transportes ins Medium ist nicht streng von der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängig, sondern andere Faktoren können die zeitlich vorgelagerte oder verzögerte cAMP-Ausschüttung bestimmen.

Für zwei 13^{o}C-Versuche wurde ebenfalls die cAMP-Ausschüttungsrate errechnet. V_{max} für die PDE-Hydrolyse liegt bei 2.12 und 0.64 /uM x min^{-1} / 2 x 10^{11} Zellen. Auch hier laufen Synthese und Transport nicht parallel. In beiden Versuchen bleibt während des Anstiegs des intrazellulären cAMP-Spiegels die Transportrate noch auf ihrer Grundlinie (um ca. 0.5 und ca. 0.1 /uM/min), erreicht zwar im intrazellulären cAMP-Peak ebenfalls seine Maximalwerte (6.6 und 1.7 /uM/min), aber fällt schon wieder ab bevor - in einem Versuch 3.5 min - die intrazelluläre Konzentration auf das Grundniveau abgesunken ist. Hier treten als Besonderheit negative Werte in der Ausschüttungsrate auf; das würde bedeuten, die für die 22^{o} C-Versuche angenommene PDE-Hydrolyseberechnung ist nicht auf die 13^{o} C-Versuche übertragbar, oder aber die Zellen transportieren aktiv cAMP vom Medium zurück ins Zellinnere.

3.6. EGTA- und Ca^{++}-Gaben: ihre Wirkung auf spontane Oscillationen

Da beim Vorgang der Muskelkontraktion Ca^{++}-Ionen eine wichtige Rolle spielen, war die Frage, ob bei Dictyostelium die durch chemotaktische Stimuli ausgelöste Zellbewegung ein Ca^{++}-abhängiger Prozess ist.

In einem homogenen System - wie es bei Zellsuspensionen der Fall ist - sind die Zellen zwar nicht in der Lage, chemotaktisch zu reagieren, aber die optisch registrierbaren Aenderungen spiegeln wahrscheinlich eine Veränderung der Zellform oder des Volumens wider.

Ca^{++}-Pulse bewirken kein Phaseshift oder Auslöschen der spontanen optischen Spikes, was durch cAMP-Pulse erreicht werden kann. Somit scheidet Ca^{++} als ein weiteres Transmittermolekül bei der Signalübermittlung während der Spikebildung aus. Dennoch ist Ca^{++} ein am Signalsystem beteiligter

Faktor. Gibt man nämlich in eine spontan oscillierende Zellsuspension EGTA, so nimmt die Amplitude der Schwingungen ständig ab und führt schliesslich zum Auslöschen der optischen Signale, wenn eine EGTA-Konzentration von ca. 2 - 3 x 10^{-3} M erreicht ist. Mit anschliessend appliziertem Ca^{++} jedoch können die Zellen wiederum zum Schwingen gebracht werden. Ein geringer Ueberschuss von Ca^{++} über die EGTA-Konzentration genügt, um die vorher erreichte Signalhöhe wieder zu erhalten (Fig. 20) (70).

EGTA als Komplexbildner bindet neben Ca^{++} auch andere zweiwertige Kationen, wenn auch die grössere Affinität zu Ca^{++} besteht. EDTA dagegen besitzt eine etwas niederere Affinität zu Ca^{++}, so dass bei Anwesenheit von anderen Ionen, z.B. Mg^{++}, diese um die Bindung am Komplex kompetieren können.

Gibt man also zu einer optisch schwingenden Zellsuspension zuerst EDTA, so wird Ca^{++} neben anderen Kationen im Medium gebunden. Bietet man danach Mg^{++} an, so kann dieses mit dem Ca^{++} kompetieren und ein Teil des Ca^{++} wird wieder freigesetzt. Setzt man abschliessend der Zellsuspension EGTA zu, so sollte dann das freigesetzte Ca^{++} wieder komplex gebunden werden.

Dies würde heissen, die Zellen sollten nach der EDTA-Zugabe aufhören zu schwingen (vgl. Fig. 20). Die Mg^{++}-Pulse danach sollten jedoch einen Neubeginn der Oscillationen ermöglichen, da notwendiges Ca^{++} ins Medium freigesetzt wird. Das abschliessend zugesetzte EGTA würde dieses "freie Ca^{++}" wiederum binden und zum Auslöschen der Oscillation führen. Diese Annahme konnte in kombinierten EDTA-Mg^{++}-EGTA-Versuchen bestätigt werden. Damit ist die Beteiligung von Ca^{++} am Signalsystem sehr wahrscheinlich.

3.7. Verlauf des cAMP- und cGMP-Spiegels bei spontan oscillierenden Zellen vor und nach EGTA-$CaCl_2$-Gaben

Die Messung des cAMP- und cGMP-Spiegels an spontan oscillierenden Zellen (t 4.5) sollte klären, ob und in welcher Form das spontane Signal- und Relayingsystem der zykli-

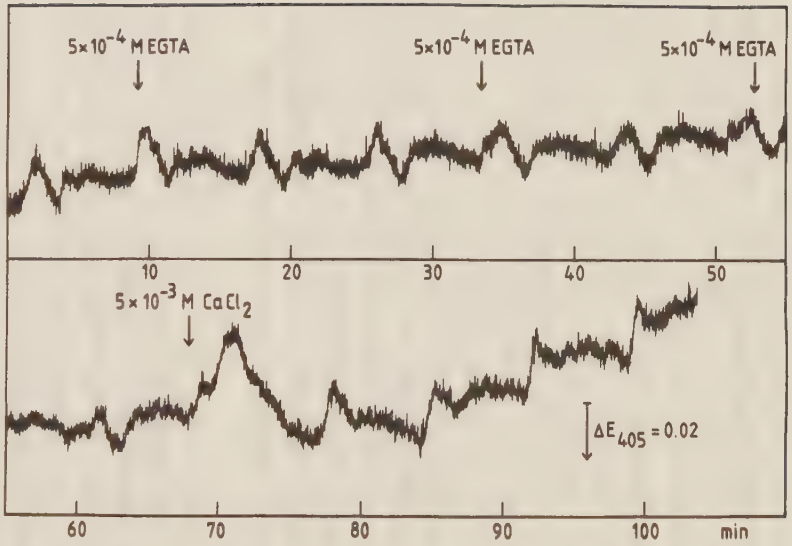

Fig. 20: Inhibierung der spontanen Lichtstreuungsänderungen bei aggregierenden Ax - 2 Zellen durch wiederholte EGTA-Zugabe und Wiederherstellung der spontanen optischen Oscillationen durch Zugabe von Ca^{++} im Ueberschuss.

schen Nukleotide durch EGTA und Ca^{++} beeinflusst wird (Fig. 21).

Beim spontanen optischen Spike vor den EGTA-Gaben steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration auf das 21.6-fache an (auf 20.6 x 10^{-6} M im Peak gegenüber 0.96 x 10^{-6} M auf der Grundlinie nach dem Peak), die extrazelluläre auf das 622- fache an (von 17.4 x 10^{-8} M im Peak im Vergleich zu 0.03 x 10^{-8} M auf der Grundlinie nach dem Peak). Auch das intrazelluläre cGMP erhöht sich um das 29.4- fache (3.2 x 10^{-6} M im Peak gegenüber 0.11 x 10^{-6} M auf der Grundlinie nach dem Peak), jedoch ist die cGMP-Synthese nicht mit einem signifikanten Release des Nukleotids ins Medium verbunden. Die Halbwertsbreite des Signals beträgt bei intrazellulärem cAMP 65 sec, für extrazelluläres 51 sec und für intrazelluläres cGMP 90 sec.

Im Abstand von 7 min wurde anschliessend die Zellsuspension 3 mal mit jeweils 0.9 x 10^{-3} M EGTA vor einem erwarteten spontanen optischen Spike versetzt. Dabei nimmt die Amplitude des optischen Signals nach jeder EGTA-Zugabe ab (Δ E bei 405 nm von 1.84% nach den EGTA-Gaben zu 3.68% davor). Nach der dritten EGTA-Zugabe wurde der cAMP- und der cGMP-Verlauf gemessen. Obwohl die spontane optische Antwort deutlich verringert ist, bleiben die intrazelluläre cAMP- und cGMP-Synthese wie auch die Ausschüttung des cAMP ins Medium unbeeinflusst. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht sich auf das 25- fache (23.2 x 10^{-6} M im Peak zu 0.94 x 10^{-6} M nach dem Peak). Das extrazelluläre cAMP erreicht im Peak einen 271- fachen Konzentrationsanstieg (13.6 x 10^{-8} M im Peak zu 0.05 x 10^{-8} M nach dem Peak). Das intrazelluläre cGMP erhöht sich auf das 20- fache (3.7 x 10^{-6} M im Peak zu 0.19 x 10^{-6} M nach dem Peak). Anders als beim zuerst gemessenen, nicht durch EGTA beeinflussten spontanen optischen Spike ist hier die cGMP-Synthese mit einem Release ins Medium gekoppelt, wenn auch in viel schwächerer Form als beim cAMP-Release. So steigt das extrazelluläte cGMP nur um das 3.4-fache an (von 2.2 x 10^{-8} M im Peak gegenüber 0.65 x 10^{-8} M

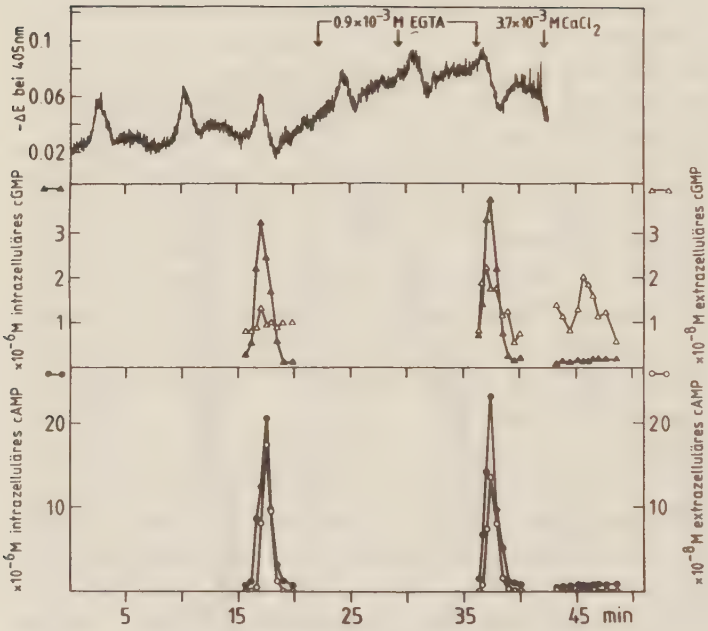

Fig. 21: Die Wirkung von EGTA - Ca^{++} - Gaben auf spontane optische Oscillationen bei aggregierenden Zellen ($t_{4.5'}$ Ax - 2).

oben: Die Lichtstreuung kann nach der Ca^{++} - Zugabe nicht weiterregistriert werden, da die häufige Probenentnahme das Küvettenvolumen reduziert und zu starkem Rauschen führt.

Mitte: Intra- und extrazellulärer cGMP-Verlauf vor und nach den EGTA-Gaben und nach der Ca^{++} - Zugabe.

unten: Intra- und extrazellulärer cAMP-Verlauf vor und nach den EGTA-Gaben und nach der Ca^{++} - Zugabe.

nach dem Peak). Auch ist die Signalbreite für extrazelluläres cGMP mit 154 sec aussergewöhnlich gross verglichen zu der von 78 sec für intrazelluläres cGMP, von 60 sec für intrazelluläres cAMP und 62 sec für extrazelluläres cAMP. 53 sec nach dem optischen Signal erscheinen zeitlich zusammen der intra- und extrazelluläre cAMP-Peak sowie der intrazelluläre cGMP-Peak, um 23 sec vorgelagert der extrazelluläre cGMP-Gipfel. Vor der EGTA-Zugabe dagegen erscheint der intrazelluläre cGMP-Peak synchron zum optischen Signal, der intra- und extrazelluläre cAMP-Gipfel nur um 28 sec verzögert.

Nach den EGTA-Gaben wurde zur Zellsuspension ein Ueberschuss an $CaCl_2$ (1 mM) gegeben. Dies führt normalerweise zur Wiederherstellung der spontanen optischen Schwingungen (vgl. Fig. 20). Die Frage war nun, ob eine Veränderung im cAMP - cGMP - Signalsystem durch die hohe Ca-Gabe erfolgt.

Nach der $CaCl_2$-Zugabe liegt der intra- und extrazelluläre cAMP-Spiegel unverändert auf einer mittleren cAMP-Konzentration von 0.68×10^{-6} M, bzw. 0.16×10^{-8} M. Auch das intrazelluläre cGMP bleibt auf einer Grundlinie von durchschnittlich 0.15×10^{-6} M. Es wird jedoch cGMP ins Medium ausgeschüttet. Das extrazelluläre cGMP-Signal ist mit einem 2.2- fachen Konzentrationsanstieg verhältnismässig klein (2×10^{-8} M im Peak zu 0.9×10^{-8} M nach dem Peak) und aussergewöhnlich breit (192 sec Halbwertsbreite). Wegen des starken, durch häufige Probenentnahme verursachten Rauschens kann bei diesem Versuch der optische Kurvenverlauf nicht mehr registriert werden. So kann keine Aussage gemacht werden, inwieweit nach dem $CaCl_2$-Puls das spontane optische Signalsystem wiederhergestellt wird.

3.8. Spontaner ^{45}Ca-Release bei EDTA-behandelten und unbehandelten Zellen

Aggregationsreife Zellen werden mit Ca^{++}-freiem Medium gewaschen und danach mit $^{45}CaCl_2$ inkubiert. Nach Entfernen des nicht aufgenommenen ^{45}Ca aus dem Ueberstand wur-

de ein Teil der Zellsuspension mit EDTA versetzt (Endkonzentration 1 x 10^{-3} M), der andere blieb unbehandelt. In beiden Zellsuspensionen wurde anschliessend die spontane ^{45}Ca-Abgabe in den Ueberstand wie auch die Abnahme der ^{45}Ca-Markierung im Sediment gemessen.

Die in der Abbildung 22 aufgetragenen Werte stellen prozentuale ^{45}Ca-Aenderungen im Ueberstand und im Sediment bezogen auf die Gesamtmarkierung dar. Die Gesamtmarkierung wird errechnet aus der Summe von ^{45}Ca (cpm) im Ueberstand und Sediment. Beim Entfernen des nicht aufgenommenen ^{45}Ca verbleibt über dem Sediment ein radioaktiver Waschwasserrest, der beim Resuspendieren der Zellen die cpm im Ueberstand erhöht. Die ^{45}Ca-Releasewerte im Ueberstand (cpm) sind deshalb um diesen Wert korrigiert. Da bei jeder Probenentnahme vom Ueberstand 7.21% beim Zentrifugieren ins Sediment mitgerissen werden (7.21% Kontamination errechnet anhand von Versuchen mit ^{14}C-Inulinmarkierung), müssen die gemessenen Sedimentwerte (cpm) um diesen Betrag (cpm) korrigiert werden. Vom angebotenen ^{45}Ca werden 4.77% in die Zellen aufgenommen.

Die spontane ^{45}Ca-Ausschüttung in den Ueberstand nimmt stetig ab bis ein Plateau erreicht wird und zwar nach 20 - 25 min bei den unbehandelten und nach 15-20 min bei den EDTA-behandelten Zellen. Danach erfolgt ein weiterer ^{45}Ca-Ausstrom in einer langsameren Reaktion. Bei den EDTA-behandelten Zellen befindet sich schon nach 7.5 min die Hälfte des aufgenommenen ^{45}Ca im Medium, bei den unbehandelten Zellen erst nach 35 min. Bei den unbehandelten Zellen ist nach 50 min noch 30.3% der Gesamtmarkierung im Sediment, 69.7% befindet sich im Medium, bei den EDTA-behandelten Zellen sind die entsprechenden Werte 12.2% und 87.8%. Da jedoch das Zellvolumen nur 5% von der Zellsuspension ausmacht, wird die extrazelluläre Radioaktivität um das 20- fache verdünnt (von 69.7% auf 3.5% und von 87.8% auf 4.4%). Das entspricht einer Verteilung des ^{45}Ca von 9 im Sediment zu 1 im Ueberstand für unbehandelte Zellen, bzw. von 3 : 1 bei den EDTA-behandelten Zellen.

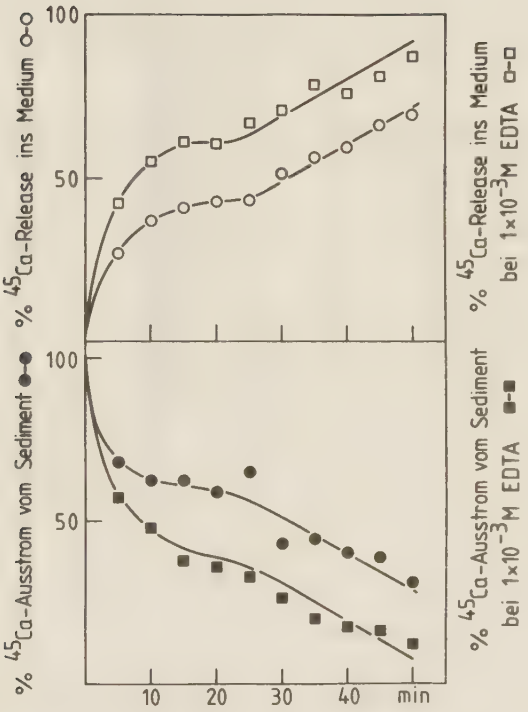

Fig. 22: Spontaner Release von ^{45}Ca ins Medium bei vormarkierten aggregationsreifen Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit von EDTA (oben).

Spontaner Ausstrom von ^{45}Ca vom Sediment bei vormarkierten aggregationsreifen Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit von EDTA (unten).

Die Testbedingungen und die Berechnung der Werte sind im einzelnen im Methodenteil unter 2.8. und unter 3.8. im Ergebnisteil beschrieben.

Die ^{45}Ca-Abnahme im Sediment zeigt den entsprechenden gegenüber der Abgabe ins Medium umgekehrten Kurvenverlauf. Die Messwerte der Sedimente sind jedoch mit einem grösseren Fehler behaftet und zeigen daher eine grössere Streuung.

Die Geschwindigkeit der ^{45}Ca-Abgabe ins Medium fällt stetig ab und wird nach 35 - 40 min nahezu null. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ist die Abgaberate bei den EDTA-behandelten Zellen anfänglich 1.57 x und nach 50 min 1.23 x grösser.

3.9. Aenderungen der ^{45}Ca-Abgabe nach cAMP-Pulsen an ^{45}Ca-markierten Zellen

Aggregationsreife Zellen wurden in Ca^{++}-freiem Puffer gewaschen und anschliessend mit $^{45}CaCl_2$ inkubiert. Nach Entfernen des nicht aufgenommenen $^{45}CaCl_2$ wurden die Zellen resuspendiert, weitergeschüttelt und die spontane ^{45}Ca-Abgabe vom Sediment in den Ueberstand registriert. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Zellsuspension mit 1 x 10^{-6} M cAMP (Endkonzentration) gepulst und die Veränderung der ^{45}Ca-Abgabe nach dem Puls gemessen (65).

Die in der Abbildung 23 aufgetragenen Werte wurden aus 8 Pulsversuchen ermittelt. Zur Bestimmung der spontanen ^{45}Ca-Abgabe wurden die im Ueberstand jeweils 30 sec (y_1) vor und 510 sec (y_2) nach einem cAMP-Puls gemessenen cpm-Werte linear miteinander verbunden. Alle auf dieser Geraden liegenden Werte (y_m) entsprechen 0% Aenderung in der ^{45}Ca-Abgabe. Die tatsächlich gemessenen Werte für die ^{45}Ca-Abgabe (cpm) im Ueberstand nach dem Puls werden in %-Aenderung zu den errechneten y_m-Werten ausgedrückt. Liegt bei den 8 Versuchen ein Messwert nicht bei 5, 20 usw. sec, so wird er aus der Releasekurve des entsprechenden Versuches extrapoliert.

Es zeigt sich, dass schon 5 sec nach dem cAMP-Puls ein Einstrom in die Zellen (11.23%) stattfindet, der kontinuierlich nachlässt und der nach spätestens 510 sec abgeschlossen ist.

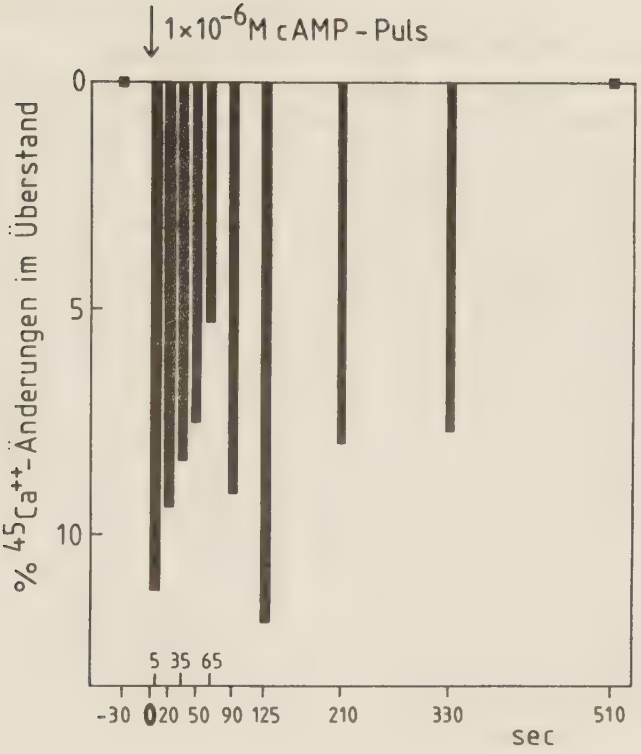

Fig. 23: Aenderungen in der ^{45}Ca-Abgabe nach cAMP-Pulsen an vormarkierten aggregationsreifen Zellen.

In die Abbildung gehen die Mittelwerte aus acht Pulsversuchen ein. Der Zeitpunkt der cAMP-Injektion wird O gesetzt. Die errechneten prozentualen Aenderungen im Ueberstand in den Intervallen nach dem Puls beziehen sich jeweils auf den vor dem Puls gemessenen Wert. Die Testbedingungen sind im Methodenteil unter 2.8. und die Ausrechnung der Werte in den Ergebnissen unter 3.9. ausführlich beschrieben.

3.10. ^{45}Ca-Aufnahme nach cAMP-Pulsen an nicht vormarkierten Zellen bei 22° C und bei 13° C.

Eine andere Serie von Ca-Versuchen an nicht vormarkierten Zellen sollte eine Aussage über die Ca-Aufnahme nach einem cAMP-Puls geben. Dazu wurde das optische Verhalten der Zellen vor dem Versuch durch cAMP-Testpulse geprüft, wobei eine biphasische Antwort hoher Amplitude als Kriterium der Aggregationsreife galt. Auch während des Ca-Versuches wurde die "light scattering-Antwort" auf einen cAMP-Puls registriert. Dadurch war eine Kontrolle der Zellreaktivität möglich, die bei den vorigen Experimenten mit vormarkierten Zellen nicht gegeben war. Das dort notwendige extensive Waschen zur Entfernung des nicht aufgenommenen ^{45}Ca konnte die Zellen unterschiedlich in ihrer Aktivität beeinträchtigen, was die verhältnismässig grosse Streuung in den einzelnen Experimenten erklären könnte. Durch die kurze Markierungszeit (durchschnittlich 15 min) mit niedrigen ^{45}Ca-Dosen (0.02 μCi/1 x 10^8 Zellen gegenüber 8.8 μCi/1 x 10^8 Zellen bei den Vormarkierungsversuchen) sollten auch noch geringe Aenderungen im Ca-Spiegel vor allem im Sediment messbar sein (65).

Nach dem externen cAMP-Puls (2 - 4 μM) nimmt das extrazelluläre ^{45}Ca im Durchschnitt nach 16 sec ab (das entspricht der ersten Probenentnahme nach 8, 12, und 27 sec) und erreicht nach ca. 40 sec seinen Maximalwert (Fig. 24 A). Die prozentualen Aenderungen im Minimum zu den Werten vor dem Puls (100%) liegen bei 36.3%, 11% und 10%. Entsprechend der ^{45}Ca-Abnahme im Ueberstand steigt das zellulär gebundene ^{45}Ca an. Die prozentuale Aenderung des ^{45}Ca-Spiegels kann im Sediment höhere Werte als im Ueberstand erreichen, sobald die Markierung im Sediment niedriger ist als im Ueberstand (Fig. 24 B).

Nach diesem Peak strömt wiederum ^{45}Ca von den Zellen zurück ins Medium, wobei jedoch nicht der gleiche Ca-Spiegel wie vor dem cAMP-Puls erreicht wird. Das bedeutet, die Zellen halten einen Teil des eingeströmten ^{45}Ca zurück.

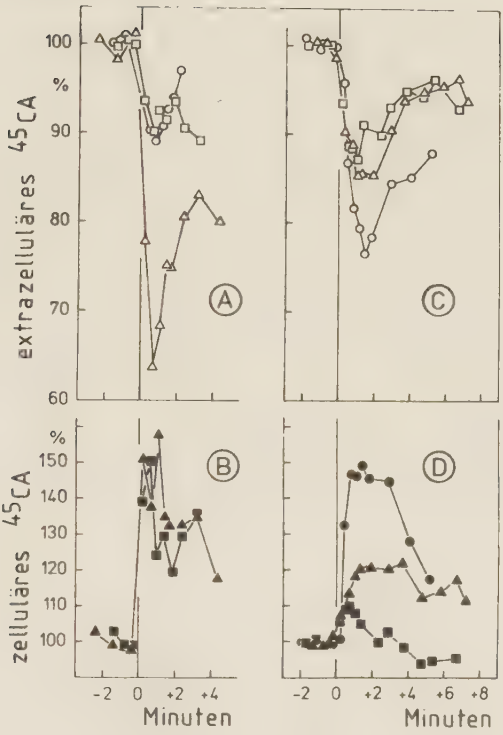

Fig. 24: cAMP stimulierter Einstrom von ^{45}Ca.

Die Versuche in A und B wurden bei 23° C in C und D bei 13° C durchgeführt. Offene Symbole stellen extrazelluläres ^{45}Ca und geschlossene Symbole zelluläres ^{45}Ca dar. X-Achse: cAMP wird zum Zeitpunkt O zugegeben. Y-Achse: Der Durchschnitt des ^{45}Ca-Spiegels in den Proben vor der cAMP-Stimulierung wird 100% gesetzt. Die unterschiedlichen Grössen im Zellvolumen wurden normalisiert auf ein Zellvolumen von 10%. Die zum Stimulieren verwendeten cAMP-Konzentrationen und die gemessenen Werte des Zellvolumens sind folgende: A,B: △, ▲, 2/uM (6%), ○, ●, 2/uM (2%) und □, ■, 4/uM (10%). C,D: ○, ●, 2/uM (7%), □, ■, 3/uM (13%) und △, ▲, 4/uM (13%).

Die Ca-Antwort auf einen cAMP-Puls bei 13° C zeigt einen ähnlichen insgesamt aber langsameren Verlauf wie bei 22° C (Fig. 24 C und D). Zwar beginnt der ^{45}Ca-Einstrom schon sehr schnell innerhalb durchschnittlich 13 sec (entsprechend der jeweils ersten Probenentnahme bei 6, 12 und 21 sec nach dem Puls), jedoch werden das extrazelluläre Minimum und entsprechend das intrazelluläre Maximum erst nach 68 sec erreicht, was einem Verzögerungsfaktor von 1.7 entspricht. Die prozentualen Aenderungen im extrazellulären ^{45}Ca-Spiegel liegen bei 13° C mit 23.5%, 14.7% und 13% im gleichen Bereich wie bei 22° C. Der Rückstrom des ^{45}Ca vom Sediment ins Medium verläuft bei 13° C ebenfalls langsamer als bei 22° C.

Pulst man die Zellen mit 5' AMP, dem Hydrolyseprodukt der cAMP-Phosphodiesterase, so findet keine signifikante Aenderung im Ca-Spiegel statt (65) (Fig. 25).

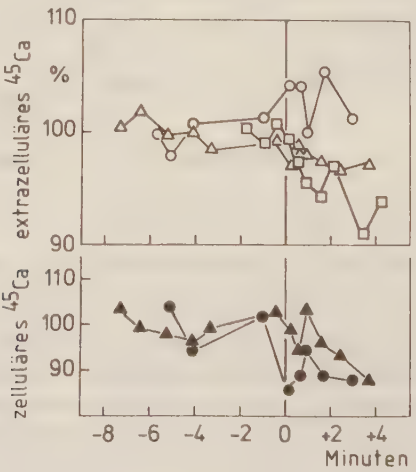

Fig. 25: Verteilung von ^{45}Ca nach Zugabe von 5'AMP zum Zeitpunkt 0.

In drei Experimenten wurde das extrazelluläre ^{45}Ca gemessen, in zwei davon auch das zelluläre ^{45}Ca. 5'AMP-Pulshöhe und Werte des Zellvolumens: △, ▲, 2/uM (9%); □, ■, 2/uM (7%); ○, ●, 4/uM (10%).

4. Diskussion

4.1. Aenderungen im intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel bei spontanen optischen Oscillationen

Die Zellen sind in der Lage, ihre Aktivitäten endogen über grössere Zeiträume zu synchronisieren, sichtbar in spontanen, optischen Oscillationen in der "geschüttelten Zellsuspension". Geht man davon aus, dass für die Synchronisation ein chemisches Kopplungsglied verantwortlich ist, so muss dieses Agens seine Konzentrationen im extrazellulären Raum entsprechend den optischen Oscillationen rhythmisch ändern. Erste Versuche (13) konnten zeigen, dass bei Dictyostelium discoideum die Kopplung von cAMP übernommen wird. Die hier durchgeführten gleichzeitigen Messungen von intra- und extrazellulärem cAMP-Spiegel sollten den Verlauf von Synthese und Transport klären.

Synchron zum optischen Spike ist ein steiler Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration innerhalb von 1 - 2.5 min zu beobachten, wobei die gemessenen Werte im Peak durchschnittlich 10- fach höher liegen als im Background. Die Halbwertsbreite des intrazellulären Peak beträgt durchschnittlich 1.25 min (52). Diesen periodischen Aenderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration liegt eine periodische Aktivierung der Adenylcyclase zugrunde. Zeitlich mit den spikeartigen optischen Signalen zusammenfallend kommt es zu einer vorübergehenden Stimulation der Adenylcyclase um den Faktor 7 (31). Während eines optischen Spikes steigt die Enzymaktivität für 2 - 3 min steil an. Die Zeitdauer der Aktivierung - charakterisiert durch die Halbwertsbreite - beträt 2 min. Somit führen beide Versuchsmethoden zu übereinstimmenden Ergebnissen. Die Peakkonzentration für intrazelluläres cAMP minus der Backgroundkonzentration zwischen den Pulsen entsprechen 1×10^7 Molekülen cAMP synthetisiert pro Puls und Zelle. Zieht man noch das vor dem Erreichen des intrazellulären Peaks ausgeschüttete cAMP in Betracht, so kommt man auf eine Pulsgrösse von 1.2×10^7 Molekülen cAMP pro Zelle (66).

Der Transport des cAMP erfolgt mit einer gewissen Verzögerung zur Synthese. Erst nachdem die intrazelluläre cAMP-Synthese schon begonnen, jedoch bevor sie ihr Maximum erreicht hat, findet eine merkliche cAMP-Ausschüttung ins Medium statt. Dies weist auf eine Phase hoher Synthese- wie auch Transportaktivität der Zellen hin. Bis auf das 25- fache über die Basislinie kann sich die extrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, wobei der Peak für extrazelluläres cAMP 30 - 45 sec später als für intrazelluläres erreicht wird. Damit dauert die cAMP-Ausschüttung ins Medium noch an, wenn die intrazelluläre cAMP-Konzentration schon wieder abnimmt. Die Dauer der gesamten Signalphase setzt sich somit aus der für die Synthese von cAMP und seinen transmembranen Transport benötigten Zeit zusammen (52, 66). Die Halbwertsbreite des extrazellulären Spikes beträgt durchschnittlich 100 sec. Diese Grösse stimmt mit dem Wert von 90 sec überein, der anhand einer anderen Technik für die Halbwertsbreite mit experimentell induzierten cAMP-Pulsen gefunden wurde (15) und steht ebenso in Einklang mit den Aktivitätsphasen der Aggregationszentren (10). Während eines spontanen Pulses werden ca. 4.8×10^6 Moleküle cAMP pro Zelle ausgeschüttet. Die Peakhöhe für extrazelluläres cAMP ist viel geringer als man vom internen Puls her erwarten könnte. Dies ist auf die Verdünnung des cAMP ins Medium wie auch auf die Aktivität der membrangebundenen PDE zurückzuführen. Vergleicht man die cAMP-Konzentration/l Zellsuspension, die intrazellulär vor einem Spike vorhanden ist, mit derjenigen im extrazellulären Peak, so findet man bei letzterer 2 - 3- fach höhere Werte. Das bedeutet, - selbst ohne Berücksichtigung der PDE-Hydrolyseaktivität -, dass der grösste Teil des ins Medium ausgeschütteten cAMP neu synthetisiert wurde. Damit scheint eine Langzeitspeicherung im interzellulären Signalsystem keine wesentliche Rolle zu spielen (52).

Die cAMP-Peaks im intrazellulären Kompartiment fallen mit den Peaks der Lichtstreuungsänderungen zeitlich enger zusammen als im extrazellulären. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die beobachteten Lichtstreuungsänderungen in Form von spontanen Spikes Antworten der Zellen auf ihren internen cAMP-Pool widerspiegeln. Dabei kommt der Regulation der Adenylcyclase während der Oscillationsaktivitäten eine primäre Rolle zu, wobei die Mitwirkung von Permeabilitätsänderungen im Signalsystem nicht ausgeschlossen ist. Der Dictyostelium-Oscillator unterscheidet sich von anderen chemischen oder biochemischen Oscillationssystemen - wie die Zhabotinsky-Belousov-Reaktion (48, 49) oder die Glykolyse von Hefeextrakten (50) - durch das Vorhandensein von zwei Kompartimenten, nämlich dem intra- und extrazellulären Raum, getrennt durch die Plasmamembran. In diesen Kompartimenten oscilliert cAMP mit unterschiedlicher Amplitude und Phase. cAMP wird intrazellulär synthetisiert, dann ins Medium ausgeschüttet, von wo es auf seine eigene Synthese über die Rezeptoren an der Zelloberfläche wiederum rückwirken kann. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, dass die Plasmamembran ein wesentlicher Bestandteil des Oscillators ist, indem sie sowohl den cAMP-Transport von innen nach aussen übernimmt wie auch als Signalübersetzer in der umgekehrten Richtung wirkt. Hiermit kann auch die Frage beantwortet werden, ob die Zellen auf einen kontinuierlichen Gradienten oder auf ein diskontinuierliches Signal reagieren, das von einem rhythmisch pulsierenden Aggregationszentrum abgegeben wird. Das cAMP-Signal wird in Zellsuspensionen tatsächlich periodisch synthetisiert und ins Medium ausgeschüttet, wobei dieses periodische Signal in hohem Masse dem periodischen Signalisieren der Aggregationszentren auf Agarplatten entspricht.

Die Fähigkeit, sowohl spontane Lichtstreuungssignale in Form von Spikes auszubilden als auch zeitlich korreliert zu diesen mit einer pulsförmigen cAMP-Synthese und Transport zu reagieren unterliegt einer entwicklungsabhän-

gigen Kontrolle. In Suspensionen vegetativer Zellen können keine spontanen Lichtstreuungsänderungen registriert werden. Messungen des intra- und extrazellulären cAMP-Spiegels an Zellen des vegetativen Stadiums ergaben keine spontanen Aenderungen, wobei die intrazelluläre cAMP-Konzentration zwischen 1.5 - 2 /uM lag, die extrazelluläre bei ca. 0.1 - 0.15 /uM. Verglichen dazu liegt der cAMP-Spiegel bei aggregierenden Zellen in der Phase zwischen den spontanen Spikes bei ca. 3 /uM für intrazelluläres und bei 0.15 /uM für extrazelluläres cAMP bei einer Zelldichte von 2×10^8/ml. Somit unterscheiden sich die cAMP-Basislinien zwischen signalisierenden und nicht signalisierenden Zellen im intrazellulären Kompartiment maximal um den Faktor 2, im extrazellulären sind sie fast identisch. Die hier gefundenen cAMP-Werte während der Aggregationsphase stimmen mit denen von Brenner (71) gut überein. Er findet allerdings einen drastischen Anstieg des cAMP-Spiegels vom vegetativen zum Aggregationsstadium, er führte jedoch seine Messungen an Filtersupports durch, wobei pulsende und nicht pulsende Zellen ohne Unterscheidungsmöglichkeit mit in die Rechnung einbezogen wurden.

Wie die oben erwähnten Ergebnisse an Zellsuspensionen zeigen, besteht in den einzelnen Differenzierungsstadien eine enge Korrelation zwischen dem cAMP-Spiegel und dem gewählten Parameter der Lichtstreuungsänderungen. Waren keine spontanen Lichtstreuungsänderungen registrierbar, so konnten auch keine spontanen Aenderungen der cAMP-Konzentration gemessen werden; in den spontanen optischen Spikeperioden traten auch gleichzeitig spontane intra- und extrazelluläre cAMP-Oscillationen auf. Während dieser Entwicklungsphase übernimmt cAMP die Aufgabe eines Signalkopplers. Den Spikeoscillationen folgen in der späten Aggregationsphase sinusförmige Lichtstreuungssignale, die über Stunden hinweg durchgehalten werden können. Wie cAMP-Messungen an Zellsuspensionen dieses Stadiums zeigen, verharrt der extrazelluläre cAMP-Verlauf in allen Versuchen auf einer Grund-

linie. Da also cAMP im extrazellulären Raum seine Konzentrationen entsprechend den optisch registrierbaren Schwingungen nicht rhythmisch ändert, scheidet es als möglicher diffundierender Transmitter während der Sinusschwingungen aus. Dieses Ergebnis war nicht unbedingt von den intrazellulären cAMP-Messungen vorherzusehen. Bei der Hälfte der Versuche war im "Tal der Sinusschwingung" ein periodischer Anstieg des intrazellulären cAMP zu verzeichnen, wenn auch zu den optischen Spikes vergleichsweise ein viel geringerer. In den übrigen Versuchen waren keine Aenderungen des internen cAMP messbar. Projiziert man den zeitlichen Verlauf der Extinktion bei den Spikeoscillationen über denjenigen bei den sinusförmigen Oscillationen, so entsprechen dem Peak der optischen Spikes das "Tal der Sinusschwingung". Da im Peak der Spikes die höchsten intrazellulären cAMP-Konzentrationen registriert worden waren, wurden im "Tal der Sinusschwingung" die höchsten cAMP-Werte erwartet. Untersuchungen über die Adenylcyclase während der sinusförmigen Lichtstreuungssignale ergaben nur unbedeutende Schwankungen der Adenylcyclaseaktivität im Bereich der Messgenauigkeit (35). Daraus ergibt sich, dass bei den Sinusschwingungen die Adenylcyclase wenn überhaupt dann in viel geringerem Masse zur Synthese angeregt wird als bei den spontanen Spikes. Es scheint auch kein messbarer Transport des cAMP ins Medium stattzufinden. Die periodisch wiederkehrenden sinusförmigen Signale benötigen zu ihrer Synchronisation sicherlich auch ein extrazelluläres Kopplungsglied. Diese Aufgabe wird anscheinend nicht von cAMP sondern durch eine andere bisher noch unbekannte Substanz übernommen.

4.2. Die Wirkung von cAMP-Pulsen auf den internen und externen cAMP-Spiegel während verschiedener Entwicklungsstadien.

Die Fähigkeit der Zellen, auf induzierte Signale zu antworten, ändert sich im Laufe der Differenzierung und unterliegt damit einer entwicklungsabhängigen Kontrolle. Anders als aggregationsreife Zellen antworten vegetative Zel-

len (ca. t_1 - t_2) auf einen cAMP-Puls nur mit einem optischen Signal, der sog. "schnellen Antwort" (18). Messungen des internen und externen cAMP-Spiegels ergaben, dass das optische induzierte Signal weder von einer erhöhten cAMP-Synthese noch von einem cAMP-Transport ins Medium begleitet ist. Während aller Versuche verbleibt sowohl der intra- wie auch extrazelluläre cAMP-Verlauf unverändert auf seiner jeweiligen Grundlinie. Damit scheint für dieses durch einen cAMP-Puls induzierte optische Signal eine Aktivierung der Adenylcyclase keine primäre Rolle zu spielen.

Zellen im Präaggregationsstadium (ca. $t_{2.5}$ - t_4) prägen wie vegetative Zellen auf einen externen Puls hin nur ein optisches Einzelsignal, die sog. "schnelle Antwort", aus. Betrachtet man einen Zellausstrich lichtmikroskopisch, so findet man keinen Unterschied zu vegetativen Zellen. Anders als bei vegetativen Zellen jedoch bewirkt ein externer cAMP-Puls bei präaggregationsreifen Zellen eine verstärkte cAMP-Synthese sowie die Ausschüttung des synthetisierten cAMP ins Medium. Eine Besonderheit tritt im zeitlichen Verlauf der cAMP-Antwort auf. Die Ausschüttung des cAMP erfolgt schon mit dem Beginn der internen cAMP-Synthese, und der extrazelluläre cAMP-Spiegel erreicht seinen Maximalwert vor dem internen cAMP-Gipfel. Ein Vergleich des cAMP-Verlaufs zu spontanen Oscillationen zeigt, dass dort der Release des cAMP ins Medium erst nach, seltener auch synchron mit der cAMP-Synthese auftritt und der extrazelluläre cAMP-Peak nie dem intrazellulären vorgelagert ist. Warum die Zellen bei gleicher induzierter optischer Antwort im vegetativen Stadium nicht, im präaggregationsreifen Stadium jedoch sowohl mit einem internen wie auch externen cAMP-Signal reagieren ist unbekannt. Es scheint, dass die induzierte "schnelle" optische Antwort nicht funktionell an cAMP-Synthese und Release gekoppelt ist. Im Gegensatz zu den vegetativen Zellen wurde bei den präaggretionsreifen Zellen ein Anstieg in der Basalaktivität der Adenylcyclase gefunden (32,31). Dies könnte eine Ursache für die unterschiedliche Reaktion in der cAMP-Antwort nach einem cAMP-Stimulus von Zellen dieser beiden Entwicklungsstadien sein.

Aggregationsreife Zellen antworten auf einen applizierten cAMP-Puls stets mit einem Doppelsignal in der Lichtstreuungsänderung: der schon bei vegetativen Zellen auftretenden sog. "schnellen Antwort", zusätzlich gefolgt von dem "langsamen Peak"(18). Die gemessenen cAMP-Antworten nach einem cAMP-Puls weichen in den einzelnen Versuchen beträchtlich voneinander ab. Es werden im cAMP-Verlauf Doppel- oder Einzelsignale gefunden, die zeitlich entweder mit der ersten oder zweiten optischen Antwort zusammenfallen. Die Ursache für die Variation in den cAMP-Signalmustern ist unbekannt. Dabei scheint die Oscillationsfähigkeit der Zellen keinen Einfluss auf die cAMP-Signalform zu haben. Zellen, die vor einem cAMP-Puls spontane optische Oscillationen zeigten, haben ein hohes Mass an Synchronität erreicht, so dass sie als Antwort auf einen cAMP-Puls ein zeitlich mit dem ersten optischen Peak zusammenfallendes cAMP-Signal erwarten lassen könnten. Diese Annahme hat sich nicht bestätigt, da auch spontan oscillierende Zellen nach einem Puls ein cAMP-Signal ausbilden können, das erst synchron zum zweiten optischen Peak auftritt. Welcher funktionelle Zusammenhang zwischen der induzierten optischen Antwort und der mit ihr verbundenen Synthese von cAMP und dessen Transport ins Medium besteht ist bisher nicht geklärt.

Ueber die Grösse des extrazellulären Signals sind verschiedentlich Berechnungen angestellt worden, die beträchtlich voneinander abweichen. Cohen und Robertson (72) kamen aus theoretischen Ueberlegungen über den Aggregationsmechanismus zu einem Wert von 3×10^9 Molekülen pro Zelle und Puls. Eine Pulsgrösse von 1×10^8 Molekülen pro Zelle ergab sich aus Experimenten, in denen Zellen mit auf iontophoretischem Weg künstlich erzeugten cAMP-Pulsen stimuliert wurden (73). Diese Werte führen jedoch zu weit überhöhten extrazellulären cAMP-Konzentrationen, die nicht den in vivo gefundenen Bedingungen entsprechen. Mit Hilfe von direkten Konzentrationsmessungen an Zellsuspensionen und

unter Berücksichtigung der Phosphodiesteraseaktivität ergab sich bei Stimulation mit 5×10^{-8} M cAMP eine Pulsgrösse von 6×10^{6} Molekülen pro Zelle (15). Direkte Messungen über Grösse und zeitlichen Verlauf der cAMP-Freisetzung anhand von Versuchen, in denen die Hydrolyse des freigesetzten cAMP durch hohe Konzentrationen von cGMP ausgeschaltet wurde, ergaben für die Pulsgrösse einen Mittelwert von 4×10^{6} Molekülen cAMP pro Zelle (31). Von den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen über die nach cAMP-Stimulierung hervorgerufene cAMP-Antwort konnte aus den extrazellulär gemessenen Werten unter Berücksichtigung der PDE-Hydrolyseaktivität eine durchschnittliche Zahl von 7×10^{6} Molekülen pro Puls und Zelle ermittelt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Roos (15, 31) errechneten Werten sehr gut überein. Da ein von den Zellen ausgeschütteter Transmitter durch Diffusion verdünnt und durch Phosphodiesterase inaktiviert wird, muss eine das Signal fortleitende Zelle als Signalverstärker wirken. Das bedeutet, das Verhältnis der Menge von ausgeschütteten Molekülen zur Zahl der ankommenden, eine Signalantwort auslösenden Moleküle muss grösser als 1 sein. Dieser Amplifikationsfaktor gewährleistet eine ungeschwächte Erregungswelle. Die von Roos (15, 31) und in dieser Arbeit errechneten Werte über die Pulsgrösse ergeben eine Amplifikation von 40 und mehr.

Während des Anstiegs des intrazellulären cAMP-Spiegels kann elektronenmikroskopisch eine Zunahme der Vesikel im Zytoplasma gefunden werden. Die während der Phase des cAMP-Transportes beobachteten Strukturen sprechen für eine Fusionierung der Vesikel mit der Plasmamembran. Das könnte bedeuten, dass das während eines Pulses synthetisierte cAMP vor seinem Transport ins extrazelluläre Medium in Vesikel gepackt wird und dass die Ausschüttung mittels Exocytose stattfindet (74). Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann eine Aussage über den zeitlichen Verlauf des induzierten Signals gemacht werden. Einerseits könnte die gemessene vorübergehende Konzentrationsänderung aus der

Summe von den einzelnen Zellen abgegebenen sehr kurzen Signalen verglichen zur Dauer des Gesamtpulses entstehen. Andererseits könnten die Zellen synchron auf einen externen Stimulus reagieren, so dass die beobachtete Aenderung im extrazellulären cAMP-Spiegel nach einem cAMP-Puls in ihrem zeitlichen Verlauf der Reaktion von Einzelzellen entspricht. Elektronenoptische Analysen über die Vesikelbildung während der Pulsantworten ergaben, dass die Standardabweichung der beobachteten Vesikelzahlen sich nach einem applizierten cAMP-Puls nicht änderte. Daraus wurde geschlossen, dass die gesamte Zellpopulation synchron reagiert (35).

Die spontanen optischen Oscillationen wie auch die durch cAMP-Pulse induzierten optischen Antworten zeigen in ihrem Signalverlauf eine starke Temperaturabhängigkeit (68). Ein Temperatursprung von 22° C (die den Standardbedingungen entsprechende Temperatur) auf 13° C führt zu einer Verzögerung in der Signalausbildung um den Faktor von ca. 2 sowohl in der ersten wie auch zweiten optischen Antwort nach einem cAMP-Puls. Ein weiterer Temperatursprung auf 3° C bewirkt schliesslich eine veränderte Signalform, denn nur noch ein optisches Signal wird nach einem cAMP-Puls mit grosser Verzögerung ausgebildet. Die Verzögerung in der Reaktionsfähigkeit der Zellen bei 13° C spiegelt sich auch im cAMP-Verlauf nach induzierten Antworten wider, wobei jedoch die Amplitude des cAMP-Signals bei diesem Temperatursprung unbeeinflusst bleibt. Auffallend ist die grosse Signalbreite in der cAMP-Antwort, was auf die verminderte Hydrolyseaktivität der Zellen bei 13° C zurückzuführen sein könnte. Bei 3° C schliesslich wird das induzierte optische Signal nicht von erhöhter Synthese oder Transport von cAMP begleitet, so dass die hier induzierte Lichtstreuungsänderung nicht mit einem cAMP-Signal in Zusammenhang zu stehen scheint. Die zum Teil beobachtete extrem hohe Basislinie im intrazellulären cAMP könnte auf einer eingeschränkten Regulationsfähigkeit der cAMP synthetisierenden und hydrolysierenden Enzyme bei dieser niedrigen Temperatur beruhen.

Die Ermittlung der Geschwindigkeit der cAMP-Ausschüttung und ihr Vergleich zur intrazellulären cAMP-Konzentration sollte klären, ob ein linearer Zusammenhang zwischen Synthese und Transport besteht. Es wurde als wahrscheinlich angenommen, dass die Ausschüttungsrate dann am grössten, bzw. am kleinsten ist, wenn auch die höchsten, bzw. niedrigsten intrazellulären cAMP-Konzentrationen erreicht werden. Die Errechnung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmasses für das Diagramm intrazelluläre cAMP-Konzentration gegen Geschwindigkeit der cAMP-Ausschüttung ergibt jedoch, dass nur knapp 60% der Gesamtvarianz sich aus der Abhängigkeit der Ausschüttungsrate von der internen cAMP-Konzentration erklären lässt. Dies bedeutet, dass zwischen dem Transport und der Synthese keine enge Korrelation besteht. Graphisch veranschaulicht werden kann dieser Befund, indem man den zeitlichen Verlauf des internen cAMP-Spiegels und denjenigen der Ausschüttungsrate übereinander aufträgt. Zum einen findet man durchaus einen parallelen Verlauf des Transportes und der intrazellulären Konzentration; zum anderen jedoch kann der Transport der Synthese vorgelagert sein - d.h. vor dem intrazellulären cAMP-Peak erreicht der Transport seine Maximalrate. Der Transport kann auch im Vergleich zur Synthese verzögert erfolgen, - d.h. wenn der interne cAMP-Spiegel schon wieder auf die Basislinie abgesunken ist, liegt die Ausschüttungsrate noch immer bei hohen Werten. Somit scheint der Mechanismus des cAMP-Transportes nicht im wesentlichen von der cAMP-Synthese abhängig zu sein, sondern andere Faktoren können die zeitlich vorgelagerte oder verzögerte cAMP-Ausschüttung bestimmen.

4.3. Refraktärität der Zellen gegenüber externen cAMP-Stimuli.

Die spontanen Lichtstreuungsänderungen (18) ebenso wie die pH-Oscillationen (75), die in Zellsuspensionen von Dictyostelium discoideum registriert werden können, sind in ihrer Phase unterschiedlich durch externe cAMP-Pulse be-

einflussbar. Abhängig von der Phase der Oscillationen, bei der ein cAMP-Puls appliziert wurde, kann es zu Verkürzungen, Verzögerungen oder keinen Verschiebungen der Phase kommen. Während und direkt nach den Lichtstreuungspeaks kann keine Phasenverschiebung beobachtet werden. Dieser Intervall entspricht der Signalphase, in der das interne cAMP ansteigt und als Transmitter ins Medium ausgeschüttet wird. Ein nach der Signalphase gegebener cAMP-Puls führt zur Phasenverzögerung. Dieser Intervall der "phase response curve" wird als Refraktärzeit des Signalsystems bezeichnet. Kurz vor der Mitte einer Signalperiode geht das System abrupt zur Phasenverkürzung über, so dass ein hier gegebener cAMP-Puls zum verfrühten Einsetzen des Signals führt. Die oben gemachten Beobachtungen spiegeln sich auch im cAMP-Verlauf wider. Ein in der Signalphase von spontanen Lichtstreuungsänderungen applizierter cAMP-Puls bleibt ohne Einfluss auf das cAMP-Spikesignal. Injiziert man im Intervall vor der Signalphase einen cAMP-Puls, so kommt es zum verfrühten Einsetzen der cAMP-Antwort. Ein im Intervall nach der Signalphase gegebener cAMP-Stimulus ruft keine Antwort im optischen und im cAMP-Verlauf hervor, d.h. die Zellen sind refraktär. Die Refraktärzeit ist ein wichtiges Element im Steuerungsmechanismus des Signalsystems. Sie sichert das Erkennen einzelner voneinander unterscheidbarer Signale, verhindert damit das Verwischen der Signalfolge und ermöglicht eine ungestörte externe Signalkopplung bei der Zellkommunikation.

4.4. cGMP-Spiegel bei spontanen optischen Oscillationen und nach cAMP-Pulsen.

Das nach einem cAMP-Puls hervorgerufene cGMP-Signal unterscheidet sich in seiner zeitlichen Charakteristik von der induzierten cAMP-Antwort bei präaggregationsreifen Zellen. Innerhalb weniger Sekunden nach dem cAMP-Puls steigt der interne cGMP-Spiegel an und erreicht seinen Maximalwert schon vor dem internen cAMP-Peak. Der rasche cGMP-Anstieg spricht dafür, dass die Guanylcyclase funktionell eng mit dem Chemorezeptor gekoppelt ist (63). Nach Stimulation mit

einer cAMP-Elektrode kommt es schon innerhalb 5 sec zu einer chemotaktischen Reaktion der Zellen, erkennbar an der Pseudopodienausstreckung zur cAMP-Quelle hin (70). Aufgrund ihrer Schnelligkeit kann die cGMP-Antwort eine Aufgabe bei der Vermittlung der Chemotaxis erfüllen. Die Zunahme im cGMP-Spiegel kann auf eine vorübergehende Aktivierung der Guanylcyclase zurückgeführt werden (76), vergleichbar der vorübergehenden Adenylcyclasestimulierung nach einem cAMP-Puls (77). Während der spontanen Lichtstreuungsänderungen, die durch Co-Oscillationen des intra- und extrazellulären cAMP-Spiegels gekennzeichnet sind, wird auch eine rhythmische Aenderung des intrazellulären cGMP-Spiegels beobachtet. Auch hier ist das cGMP-Signal dem cAMP-Signal zeitlich vorgelagert. Im Gegensatz zur induzierten Antwort findet hier kein , oder ein nur wenig signifikanter Transport der synthetisierten cGMP-Moleküle statt. Ob der Erhöhung der externen cGMP-Konzentration nach einem cAMP-Stimulus eine Aufgabe im Signalsystem von Dictyostelium zukommt, ist bisher nicht geklärt. In der Signalhöhe erreichen die cGMP-Antworten durchschnittlich niedrigere Werte verglichen mit den gemessenen cAMP-Peaks.

4.5. Der Einfluss von Ca^{++} auf das Signalsystem.

Neben den zyklischen Nukleotiden (cAMP, cGMP) zählt auch Ca^{++} zu den wichtigsten Komponenten im internen Signalsystem, welches die Aktivität vieler Zellen reguliert. Die primäre Aufgabe ist es, die Antwort der Zellen auf die verschiedenen externen Stimuli zu vermitteln. Dabei kommt der Plasmamembran gewöhnlich die Rolle eines Signalüberträgers zu, die eingehenden Signale werden empfangen und dann in diese internen Signale ("second messengers") umgewandelt, die letzlich für die zellulären Aktivitäten verantwortlich sind. Die Regulation zellulärer Aktivitäten durch Ca^{++}-Ionen auf der Ebene eines internen Signals wird bei vielen Zelltypen gefunden. So spielt Ca^{++} häufig die Rolle eines "second messengers" während des Vorgangs der Stimulus-Kon-

traktionskopplung oder im Verlauf der Stimulus-Sekretionskopplung (78).

Bei Dictyostelium discoideum haben sowohl extrazelluläres cAMP wie auch Ca^{++} Einfluss auf das Signalsystem, jedoch sind ihre Wirkungen verschieden. cAMP-Pulse verursachen Phasenverschiebungen der spontanen Lichtstreuungsantworten, dadurch liegt nahe, dass die cAMP-Rezeptoren funktionell mit dem Oscillator verbunden sind, der den cAMP-Release kontrolliert. Ca^{++} wirkt nicht neben cAMP als ein weiterer Transmitter, denn weder Frequenz noch Phase spontaner Oscillationen werden durch Ca^{++} - Applikationen beeinflusst. Calcium erscheint eher als Kofaktor für das Signalsystem notwendig, nicht jedoch für die Antwort auf cAMP-Pulse, die auch in Gegenwart von EDTA im wesentlichen unverändert ausgebildet werden (70). Die spontanen Spikeoscillationen zeigen eine grosse Empfindlichkeit gegenüber EDTA, bzw. EGTA. EGTA vermindert die Amplitude und führt schliesslich zum Auslöschen der optischen Antwort, die anschliessende Applikation von Ca^{++} führt zur Wiederherstellung der optischen Oscillationen. Die Messung der zyklischen Nukleotide ergibt, dass es auch bei sehr verringerter Amplitude nach mehreren EGTA - Gaben noch zur vorübergehenden Aktivierung der cAMP- und cGMP-Synthese sowie des cAMP-Transportes kommt, und zwar in gleicher Signalhöhe wie bei einer unbeeinflussten spontanen Oscillation. Nach anschliessender Ca^{++} - Zugabe im Ueberschuss bleibt eine signifikante Signalausprägung im cAMP- und cGMP-Verlauf aus. Es ist möglich dass der Ca^{++} - Ueberschuss (1 mM extrazellulär) zu einer Inaktivierung der Cyclasen führt, wie es z.B. schon für die Adenylcyclase berichtet wurde (32). Allerdings wäre eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} - Konzentration auf 1 mM nötig, um die Adenylcyclase von Dictyostelium discoideum um 40% zu inaktivieren (77, 31).

4.6. cAMP stimulierter Ca^{++} - Einstrom.

Aggregierende Zellen reagieren auf cAMP zum einen mit einer chemotaktischen Orientierung und zum anderen mit

einer Adenylcyclaseaktivierung, an die sich die cAMP-Sekretion anschliesst. Nach der Bindung von cAMP an Rezeptoren muss ein Uebersetzungsmechanismus in der Membran zwischengeschaltet sein, der die Rezeptoraktivierung an die nachfolgenden intrazellulären Reaktionen koppelt. Die chemotaktische Orientierung ist eine schnelle Reaktion, denn schon innerhalb 5 sec kommt es nach cAMP-Stimulierung zur Pseudopodienausstreckung (70). Darum müssen Vorgänge, die mit der Uebersetzung chemotaktischer Signale verbunden sind, innerhalb kurzer Zeit nach einem Stimulus messbar sein. Zu diesen schnellen Reaktionen gehören neben dem vorübergehenden Anstieg im cGMP-Verlauf auch Aenderungen im Ca^{++} - Spiegel. Nach cAMP-Stimulierung kommt es schon innerhalb 10 sec zu einem erhöhten Ca^{++} - Influx, wobei der Maximalwert des eingeströmten Calcium bei 23^{o} C nach 40 sec, bei 13^{o} C nach 70 sec erreicht ist. Ein Teil des zellulären Calcium erscheint wieder im externen Medium zwischen 1.5 min (bei 23^{o}C) und 3 min (bei 13^{o} C) nach der Stimulierung. Das Hydrolyseprodukt von cAMP, 5' AMP, löst keine Antwort aus (65). Die hier durchgeführten Versuche stehen im Gegensatz zu denen von Chi und Francis (79), denn diese Autoren fanden einen Ca^{++} - Ausstrom und keinen Einstrom. Sie benutzten jedoch zur Stimulierung cAMP-Konzentrationen in zweifach höheren Grössenordnungen, als sie hier eingesetzt wurden. Damit liegen sie auch weit über dem in Zellsuspensionen gemessenen cAMP-Spiegel (52). Da ihre Ca^{++} - Ausstrommessungen erst nach 9 min durchgeführt wurden, sagen sie nichts über die hier untersuchte schnelle vorübergehende Neuverteilung von Calcium aus und lassen sich kaum als in der chemotaktischen Reaktion beteiligten Vorgänge interpretieren. Zum Teil wird mehr Calcium von den Zellen aufgenommen, als es zu erwarten ist, wenn nur ein Ausgleich zwischen externem und cytoplasmatischem Raum stattfindet. Vielleicht ist der cAMP-induzierte Ca^{++} - Einstrom auf eine Veränderung in der Ca^{++} - Permeabilität der Plasmamembran zurückzuführen. Dabei kann ein aktiver Transport vom Cytoplasma in Mitochondrien oder Ve-

sikel ein Grund für die starke Ca^{++} - Aufnahme sein. Die chemotaktische Orientierung in Amöbenzellen setzt eine lokale Kontrolle der Pseudopodienaktivität voraus. Ein lokaler Anstieg des cytoplasmatischen Calciums könnte direkt mit einer Kontrolle der Kontraktilität verbunden sein, die zu chemotaktischen Aktivitäten führt. Diese Vorstellung findet Unterstützung in Untersuchungen von Nuccitelli et al. (80) über den Zusammenhang von Bewegungsaktivitäten der Amöbe Chaos chaos und der Ausbildung lokaler elektrischer Felder an der Zellmembran. Das Auftreten von Pseudopodien in bestimmten Bereichen der Membran ist demnach mit dem Auftreten nach aussen gerichteter Membranströme verbunden, die vermutlich auf Calciumtransport zurückgehen. Auch die von Condeelis und Taylor (81) durchgeführten Untersuchungen über die kontraktile Basis der amöboiden Bewegung ergeben eine direkte Beteiligung von Ca^{++} - Ionen an den Kontraktionsvorgängen.

5. Zusammenfassung

Während der Aggregation stehen die Zellen von Dictyostelium discoideum über ein komplexes Signalsystem miteinander in Verbindung. Sie sind in der Lage, ihre Aktivitäten endogen über grössere Zeiträume zu synchronisieren, sichtbar in spontanen optischen Oscillationen in der geschüttelten Zellsuspension. Teil dieses Signalsystems ist die Ausschüttung diffundierender chemischer Transmitter, die für die Kopplung der Signale verantwortlich sind. Diese Aufgabe wird von cAMP übernommen. Synchron zu den spontanen Spikeoscillationen steigt das interne cAMP innerhalb von 1 - 2.5 min drastisch an (durchschnittlich um das 10-fache), wobei eine Halbwertsbreite des Signals von ca. 85 sec gemessen wird. Diese periodischen Aenderungen des internen cAMP lassen sich auf eine vorübergehende Stimulation der Adenylcyclase zurückführen. Während eines Spikes werden ca. 1.2 x 10^7 Moleküle cAMP pro Zelle synthetisiert. Der Transport erfolgt verzögert zur Synthese. Ein ca. 25-facher Konzentrationsanstieg wird im extrazellulären Signal erreicht bei einer Halbwertsbreite von ca. 100 sec. Während der sinusförmigen Lichtstreuungsantworten ändert sich das interne cAMP nicht oder in nur geringem Masse. Es findet auch kein messbarer Transport von cAMP ins Medium statt. Somit kann cAMP in der späten Aggregationsphase nicht als Transmitter wirken. In der vegetativen Phase werden keine spontanen Lichtstreuungs- oder cAMP-Signale ausgebildet.

Die Antwort auf externe cAMP-Stimuli ändert sich in charakteristischer Weise während der Entwicklung. Vegetative und präaggregationsreife Zellen reagieren mit einem optischen Einzelsignal, dem bei vegetativen Zellen keine cAMP-Antwort zugeordnet ist, das aber bei präaggregationsreifen Zellen sowohl von Synthese wie auch Transport von cAMP begleitet ist. Bei aggregationsreifen Zellen induziert ein cAMP-Puls einen optischen Doppelpeak. Die cAMP-Antwort zeigt verschiedene Muster: es werden Doppelpeaks gemessen oder Einzelsignale, die zeitlich mit der ersten oder zweiten optischen Antwort zusam-

menfallen. Eine Temperaturerniedrigung von 22°C auf 13°C führt nach einem cAMP-Puls sowohl zur verzögerten optischen wie auch cAMP-Antwort, wobei die Halbwertsbreite des internen Signals bis auf über 3 min ausgedehnt sein kann. Bei 3°C ist das durch cAMP induzierte Lichtstreuungssignal weder von cAMP-Synthese noch Transport begleitet. Als Pulsgrösse kann ein Wert von durchschnittlich 7×10^6 Molekülen cAMP pro Zelle errechnet werden. Bei einem cAMP-Puls von 5×10^{-8} M entspricht dies einer Amplifikation von 40 und mehr. Der Mechanismus des cAMP-Transportes scheint nicht im wesentlichen von der cAMP-Synthese abhängig zu sein, da zwischen der Geschwindigkeit der cAMP-Ausschüttung und der internen cAMP-Konzentration kein linearer Zusammenhang besteht. Die Lichtstreuungsänderungen sind unterschiedlich in ihrer Phase durch cAMP-Pulse beeinflussbar. Ein während der Signalphase applizierter Puls bleibt ohne Einfluss auf das spontane Signal. Ein vor dieser Phase gegebener Puls führt zum verfrühten Einsetzen der optischen sowie der cAMP-Antwort; ein danach injizierter Puls ruft keinerlei Antwort hervor, da die Zellen refraktär sind. Die Refraktärzeit ist ein wichtiges Kontrollelement für die ungestörte Signalfolge bei der Zellkommunikation.

Die spontanen optischen Spikeoscillationen sind auch von internen cGMP-Oscillationen begleitet, jedoch findet kein Transport des Nukleotids ins Medium statt. Aufgrund seiner zeitlichen Charakteristik kann das cGMP-Signal eine Aufgabe bei der Vermittlung der Chemotaxis erfüllen. cAMP-Pulse bewirken eine vorübergehende Erhöhung des internen wie auch externen cGMP-Spiegels, wobei die Signalhöhe durchschnittlich jedoch niedriger ist als bei den induzierten cAMP-Antworten.

Ein weiteres wichtiges Element im Signalsystem ist Calcium. Die optischen Spikeoscillationen können durch wiederholte EGTA-Gaben zum Erliegen gebracht werden,durch anschliessende Ca^{++}-Gaben jedoch wiederhergestellt werden. Auch bei sehr verringerter optischer Antwort nach den EGTA-Gaben bleiben die cAMP- und cGMP-Antworten in normaler Signalhöhe erhalten. Nach einem cAMP-Puls kommt es innerhalb weniger Sekunden zu einem erhöhten Calciumeinstrom. Ein Teil des zellu-

lären Calciums wird später wieder ins Medium abgegeben. Ein 5' AMP-Puls löst keine Antwort aus. Die schnelle vorübergehende Neuverteilung von Calcium legt eine Mitwirkung dieser Komponente an Vorgängen nahe, die die chemotaktische Reaktion der Zellen regulieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Bonner, J.T. (1967), The Cellular Slime Molds, Princeton University Press, Princeton, N.J.
2. Gerisch, G. (1968), Current Topics in Developmental Biology (A.A. Moscona and A. Monroy, Eds.), Vol. 3, 157, Academic Press, New York, London.
3. Konijn, T.M. (1972), Advances in Cyclic Nucleotide Research 1, 17.
4. Konijn, T.M., Van de Meene, J.G.C., Bonner, J.T. and Barkley, D.S. (1967), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 58,1152.
5. Robertson, A., Drage, D.J. and Cohen, M.M. (1972), Science 175, 333.
6. Arndt, A. (1937), Roux' Arch. Entw. Mech. Org. 136, 681.
7. Bonner, J.T. (1947), J. Exptl. Zool. 106, 1.
8. Shaffer, B.M. (1957), Amer. Naturalist 91, 19.
9. Shaffer, B.M. (1962), Advan. Morphog. 2, 109.
10. Gerisch, G. (1971), Naturwissenschaften 58, 430.
11. Alcantara, F., Monk, M. (1974), J. Gen. Microbiol. 85, 321.
12. Shaffer, B.M. (1958), Quart. J. Microscop. Sci. 99, 103.
13. Wick, U. (1974), Diplomarbeit, Universität Tübingen, Deutschland.
14. Shaffer, B.M. (1975), Nature 255, 549.
15. Roos, W., Nanjundiah, V., Malchow, D., Gerisch, G. (1975), FEBS Lett. 53, 139.
16. Gerisch, G. (1965), Roux' Arch. Entw. Mech. 156, 127.
17. Durston, A.J. (1973), J. Theor. Biol. 42, 483.
18. Gerisch, G. and Hess, B. (1974), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 71, 2118.
19. Gerisch, G., Malchow, D. and Hess, B. (1974), "Biochemistry of Sensory Functions", (L. Jaenicke, Ed.) - Mosbacher Kolloquium 1974, Springer Verlag Heidelberg, 279.

20. Gerisch, G., Hülser, D., Malchow, D., Wick, U. (1975), Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 272, 181.
21. Darmon, M., Brachet, P., Pareira da Silva, L.H. (1975), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 72, 3163.
22. Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A., Wick, U. (1975), Nature 255, 547.
23. Green, A.A., Newell, P.C. (1975), Cell 6,129.
24. Henderson, F.J. (1975), J. Biol. Chem. 250, 4730.
25. Malchow, D. and Gerisch, G. (1973), Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 200.
26. Malchow, D. and Gerisch, G. (1974), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 71, 2423.
27. Rossomando, E.F., Sussman, M. (1972), Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 604.
28. Rossomando, E.F., Sussman, M. (1973), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 70, 1254.
29. Goldbeter, A. (1975), Nature, 253, 540.
30. Rossomando, E.F., Cutler, L.S. (1975), Exp. Cell Res. 95, 79.
31. Roos, W. (1977), Doktorarbeit, Universität Basel, Schweiz.
32. Klein, C. (1976), FEBS Lett. 68, 125.
33. Goldbeter, A., Segel, L. (1977), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 74, 1543.
34. Roos, W., Scheidegger, C., Gerisch, G. (1977), Nature 266, 259.
35. Gerisch, G., Maeda, Y., Malchow, D., Roos, W., Wick, U., Wurster, B. in "Development and Differentiation in the Cellular Slime Molds" herausgegeben von: P. Capuccinelli und J.M. Ashworth, Elsevier/Northholland, Amsterdam/New York (1977), 105.
36. Farnham, C.J.M. (1975), Exp. Cell Res. 91, 36.
37. Cutler, L.S., Rossomando, E.F. (1975), Exp. Cell Res. 95, 79.
38. Chassy, B.M. (1972), Science 175, 1016.
39. Riedel, V., Malchow, D., Gerisch, G., Nägele, B. (1972), Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 119.

40. Pannbacker, R.G., Bravard, L.J. (1972), Science 175, 1014.
41. Riedel, V., Gerisch, G. (1971), Biochem. Biophys.Res. Comm. 42, 119.
42. Gerisch, G., Malchow, D., Roos, W., Wick, U., Wurster, B. (1976), In: Sigrid Juselius Symposium on Cell Interactions in Cell Differentiation, Helsinki, Academic Press.
43. Nanjundiah, V., Malchow,D. (1976), J. Cell Sci. 22, 49.
44. Malchow, D., Nägele, B., Schwarz, H., Gerisch, G., (1972), Eur. J. Biochem. 28, 136.
45. Farnham, C.J.M. (1975), Expt. Cell Res. 91, 36.
46. Malchow, D., Fuchila, J., Nanjundiah, V. (1975),Biochem. Biophys. Acta 385, 421.
47. Karfunkel, H.R. (1975), Doktorarbeit, Universität Tübingen, Deutschland.
48. Winfree, A.T. (1972), Science 175, 634.
49. Winfree, A.T. (1974), SIAM - AMS Proceedings 8.
50. Hess, B., Boiteux, A. (1971), Ann. Rev. Biochem. 40, 237.
51. Watts, D.J. and Ashworth, J.M. (1970), Biochem. J. 119, 171.
52. Gerisch, G. and Wick, U. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 364.
53. Hale, L.J. (1965), Biological Laboratory Data, Science Paper Back, Chapman/Hall Ltd. England, 89.
54. Gilman, A.G. (1970), Proc. Nat. Ac. Sci. USA, 67, 305.
55. Gill, G.N. and Garren, L.D. (1970), Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 335.
56. Wunderwald, P., Jurz,G. und Michal, G. (1972), Aktuelle Biochemie, Beohringer Mannheim, Biochemica Werk, Tutzing.
57. Gilman, A.G. and Murad, F. (1974), In: Methods in Enzymology Vol. 38, Section 7, 49.
58. Brown, B.L.,Albano, J.D.M., Ekins, R.P.,Sgherzi, A.M. and Tampio, W. (1971), Biochem. J. 121, 561.
59. Steiner, A.L., Kipnis, D.M., Utiger, R., Parker, C. (1969), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 64, 367.
60. Cailla, H.L., Racine-Weisbuch, M.S. and Delaage, M.A.

(1973), Anal. Biochem. 56, 394.

61. Harper, J.F. and Brooker, G. (1975), J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 207.
62. Rahmsdorf, H.J., Cailla, H.L., Spitz, E., Moran, M.J. and Rickenberg, H.V. (1976), Proc. Nat. Ac. Sci. USA 73, 3183.
63. Wurster, B., Schubiger, K., Wick, U. and Gerisch, G. (1977), FEBS Lett. 76, 141.
64. Hill, A.V. (1913), Biochem. J. 7, 471.
65. Wick, U., Malchow, D. and Gerisch, G. (1978), Cell Biol. Int. Rep. Vol. 2, No. 1, 71.
66. Gerisch, G., Malchow, D. (1976), Adv. Cyclic Nucleotide Res. 7, 49.
67. Newell, P.C. (1977), Endeavour Vol. 1, No. 2, 63.
68. Wurster, B. (1976), Nature 260, 703.
69. Fischer, R.A. (1956), Statistische Methoden für die Wissenschaft, Oliver and Boyd, England.
70. Gerisch, G., Malchow, D., Huesgen, A., Nanjundiah, V., Roos, W., Wick, U. and Hülser, D. (1975), in Proceedings of the ICN - UCLA Symposium on Developmental Biology, edited by D. McMahon and C.F. Fox, W.A. Benjamin, Menlo Park, Calif. USA.
71. Brenner, M. (1978), Dev. Biol. 64, 210.
72. Cohen, M.H., Robertson, A. (1971), J. Theor. Biol. 31, 101.
73. Cohen, M.H., Drage, D.J., Robertson, A. (1975), Biophys. J. 15, 753.
74. Maeda, Y. and Gerisch, G. (1977), Exp. Cell Res. 110, 119.
75. Malchow, D., Nanjundiah, V., Gerisch, G. (1978), J. Cell Sci. 30, 319.
76. Mato, J.M., Malchow, D. (1978), FEBS Lett. 90, 119.
77. Roos, W., Gerisch, G. (1976), FEBS Lett. 68, 170.
78. Berridge, M.J. (1975), Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6, 1.
79. Chi, Y.-Y., Francis, D. (1971), J. Cell Phys. 77, 169.

80. Nuccitelli, R., Poo, M., Jaffé,L.F. (1977), J. Gen. Phys. 69, 743.

81. Condeelis, J.S., Taylor, D.L. (1977), J. Cell Biol. 74, 901.

Lebenslauf:

Name:	Ursula Wick
geboren:	22.8.46 in Westerland/Sylt, Kreis Südtondern
Eltern:	Johannes Wick, kfm. Angestellter und Edith Wick, Telefonistin
Schulausbildung:	Nach 4 Jahren Volksschule, Besuch der Mittelschule bis zum Abschluss "Mittlere Reife"; danach "Einjährige Handelschule" mit Abschluss in Singen. Nach einer Aufnahmeprüfung für den zweiten Bildungsweg Besuch der Wirtschaftsoberschule bis zum Abitur im Oktober 1966 in Singen/Htwl.
Hochschulausbildung:	Zuerst fünf Semester Studium der Germanistik, Philosophie und Geschichte; danach Wechsel in die naturwisschenschaftliche Fakultät zum Studium des Fachs Biologie in Tübingen. Abschluss nach 9 Semestern mit der Diplomprüfung (September 1973); anschliessend Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Gerisch im Miescher-Labor des Max-Planck-Institutes in Tübingen über das Thema: "Extrazellulärer und intrazellulärer cAMP-Spiegel bei spontanen optischen Oscillationen und induzierten optischen Antworten. cAMP als ein Transmitter bei der Aggregation von Dictyostelium discoideum". (Dezember 1974). Fortsetzung der Arbeit bei Prof. Gerisch in Tübingen und Basel im Biocentrum als Promotion. Während des Biologiestudiums war ich Mitglied der Studienstiftung Villigst e. V.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bayer, Bünning, Dieckmann, Gerisch, Gierer, Hasselbach, Hausen, Kretschmar, Krüger, Lorenz, Mägdefrau, Metzner, Mickoleit, Möhres, Müller, Ritter, Rüdorff, Sailer, Schwartz, Schweizer, Schwemmle, Seelig, Seyffert, Sperlich, Stegmann, Wenk, Weser, Wöhrmann, Zähner.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

1) Gerisch, G., Hülser, D. and Wick, U.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 272, 181 - 192 (1975).

2) Gerisch, G., Malchow, D., Huesgen, A., Nanjundiah, V., Roos, W., Wick, U. and Hülser, D.
Proceedings of the 1975 ICN-UCLA Symposium on Developmental Biology (D. McMahon and C.F. Fox, Eds.) W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, California (1975).

3) Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A., Wick, U.
Nature 255, 547 - 549 (1975).

4) Gerisch, G. and Wick, U.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 364 - 370 (1975).

5) Gerisch, G., Malchow, D., Roos, W., Wick, U., Wurster,B.
In: Cell Interactions in Differentiation. Sigrid Juselius Symposium, Helsinki. (L. Saxen and L. Weiss, Eds.) Academic Press, 1976.

6) Gerisch, G., Maeda, Y., Malchow, D., Roos, W., Wick, U. and Wurster, B.
Proceeding of the EMBO Workshop on Development and Differentiation in Cellular Slime Moulds (R. Cappuccinelli, Ed.) Elsevier /North Holland Biomedical Press, 1977.

7) Wurster, B., Schubiger, K., Wick, U. and Gerisch, G.
FEBS Lett. 76, 141 - 144 (1977).

8) Wick, U., Malchow, D. and Gerisch, G.
Cell Biol. Int. Rep. Vol. 2, No. 1, 71 (1978).

Offsetdruck
GmbH & Co. KG.

M. SCHADEL

86 Bamberg Hohe-Kreuz-Str 9b Tel 0951/54414 • 58461 •